

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08308585 A**(43) Date of publication of application: **26.11.96**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
C07H 21/04
C12N 7/00
/(C12N 15/09 , C12R 1:92)

(21) Application number: **07276335**(22) Date of filing: **29.09.95**(30) Priority: **15.03.95 JP 07 84891**(71) Applicant: **SUMITOMO PHARMACEUT CO LTD**

(72) Inventor: **SAITO IZUMI**
KANEGAE HIROMI
NAKAI MICHIO

(54) **RECOMBINANT DNA VIRUS AND ITS PRODUCTION**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject virus useful for sustaining gene therapy effect and capable of incorporating a wide range of animal cells with extreme gene in a stable form.

CONSTITUTION: This recombinant DNA virus is to be used for infecting animal cells therewith, has an extreme gene and a promoter controlling its manifestation, and lies entirely deleted in E2A gene function. The virus is obtained by incorporating an animal cell strain with (A) a vector incorporated with a promoter,

a recombinase gene and a poly-A sequence and (B) a recombinant DNA virus having two recombinase recognition sequences situated on both sides of E2A gene region and oriented to the same direction followed by cutting off the E2A gene region.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-308585

(43) 公開日 平成8年(1996)11月26日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 7/00		8931-4B	C 1 2 N 7/00	
// (C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 R 1:92)				

審査請求 未請求 請求項の数36 F D (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願平7-276335

(22) 出願日 平成7年(1995)9月29日

(31) 優先権主張番号 特願平7-84891

(32) 優先日 平7(1995)3月15日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72) 発明者 斎藤 泉

東京都渋谷区代々木2丁目37番15-412号

(72) 発明者 鐘ヶ江 裕美

東京都品川区西五反田8丁目10番14-1405号

(72) 発明者 中井 通雄

大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

(74) 代理人 弁理士 細田 芳徳

(54) 【発明の名称】 組換えDNAウイルスおよびその製造方法

(57) 【要約】

【解決手段】 外来遺伝子および外来遺伝子の発現を制御するプロモーターを有する、E 2 A遺伝子の機能が完全に欠失した、動物細胞感染用の組換えDNAウイルス、及びE 2 A遺伝子領域の両側に位置する同方向を向いた二つのリコンビナーゼ認識配列を有する動物細胞感染用の組換えDNAウイルス、並びにこれらの動物細胞感染用の組換えDNAウイルスの製造方法。

【効果】 本発明により、広範な動物細胞に外来遺伝子を安定な形で導入することのできる組換えDNAウイルスを提供することができる。また、本発明はこの組換えDNAウイルスの簡易な製造方法を提供する。特に、本発明の組換えアデノウイルスは遺伝病の治療に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 外来遺伝子および外来遺伝子の発現を制御するプロモーターを有する、E 2 A 遺伝子の機能が完全に欠失した、動物細胞感染用の組換え DNA ウイルス。

【請求項 2】 DNA ウイルスがアデノウイルスである請求項 1 記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 3】 E 2 A 遺伝子領域の一部または全部を欠失した請求項 1 または請求項 2 記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 4】 外来遺伝子および外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが左向きに組み込まれていることを特徴とする請求項 1 ないし請求項 3 いずれか 1 項記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 5】 アデノウイルスゲノムが E 1 A 遺伝子領域を含む 1. 3 ～ 9. 3 % 断片を欠失していることを特徴とする請求項 2 ないし請求項 4 いずれか 1 項記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 6】 E 1 A 遺伝子領域の欠失部位に外来遺伝子および外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが挿入されていることを特徴とする請求項 5 記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 7】 アデノウイルスゲノムがさらに E 3 遺伝子領域を含む 7 9. 6 ～ 8 4. 8 % 断片を欠失していることを特徴とする請求項 6 記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 8】 外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリ β-アクリンプロモーター、ウサギ β グロビンのスプライシングアクセプターおよびポリ A 配列からなるハイブリッドプロモーター (CAG プロモーター) であることを特徴とする請求項 1 ないし請求項 7 いずれか 1 項記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 9】 E 2 A 遺伝子領域の両側に位置する同方向を向いた二つのリコンビナーゼ認識配列を有する動物細胞感染用の組換え DNA ウイルス。

【請求項 10】 DNA ウイルスがアデノウイルスである請求項 9 記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 11】 二つのリコンビナーゼ認識配列の挿入部位の一方が、E 2 A 遺伝子の終止コドンと L 3 遺伝子の終止コドンの間であって、両遺伝子のポリ A 付加シグナルの機能を欠失しない範囲であることを特徴とする請求項 9 又は 10 記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 12】 もう一方のリコンビナーゼ認識配列の挿入部位が、アデノウイルスゲノムの 7 9. 6 ～ 8 4. 4 % の範囲であることを特徴とする請求項 11 記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 13】 リコンビナーゼが大腸菌 P 1 ファージ由来のリコンビナーゼ Cre である請求項 9 ないし請求項 12 いずれか記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 14】 リコンビナーゼ認識配列がリコンビナーゼ Cre の基質となる下記 lox P の DNA 配列 (配列番号: 1)

5' -ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT-3'

3' -TATTGAAGCATATCGTATGTAATATGCTTCAATA-5'

である請求項 9 ないし請求項 13 いずれか 1 項記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 15】 外来遺伝子を有することを特徴とする請求項 9 ないし請求項 14 いずれか 1 項記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 16】 外来遺伝子の発現を制御するプロモーターを有することを特徴とする請求項 15 記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 17】 外来遺伝子および外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが左向きに組み込まれていることを特徴とする請求項 16 記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 18】 アデノウイルスゲノムが E 1 A 遺伝子領域を含む 1. 3 ～ 9. 3 % 断片を欠失していることを特徴とする請求項 10 ないし請求項 17 いずれか 1 項記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 19】 E 1 A 遺伝子領域の欠失部位に外来遺伝子および外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが挿入されていることを特徴とする請求項 18 記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 20】 アデノウイルスゲノムがさらに E 3 遺伝子領域を含む 7 9. 6 ～ 8 4. 8 % 断片を欠失していることを特徴とする請求項 19 記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 21】 外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリ β-アクリンプロモーター、ウサギ β グロビンのスプライシングアクセプターおよびポリ A 配列からなるハイブリッドプロモーター (CAG プロモーター) であることを特徴とする請求項 16 ないし請求項 20 いずれか 1 項記載の組換え DNA ウイルス。

【請求項 22】 プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリ A 配列を組み込んだベクター (a) と、E 2 A 遺伝子領域の両側に位置する同方向を向いた 2 つのリコンビナーゼ認識配列を有する組換え DNA ウイルス (b) とを、動物細胞株へ導入し、2 つのリコンビナーゼ認識配列間に存する E 2 A 遺伝子領域を切除することからなる、E 2 A 遺伝子の機能が完全に欠失した組換え DNA ウイルスの製造方法。

【請求項 23】 DNA ウイルス (b) がアデノウイルスである請求項 22 記載の組換え DNA ウイルスの製造方法。

【請求項 24】 さらにベクター (a) がアデノウイルスである請求項 23 記載の組換え DNA ウイルスの製造方法。

【請求項 25】 2 つのリコンビナーゼ認識配列の挿入

部位の一方が、E2A遺伝子の終止コドンとL3遺伝子の終止コドンの間であって、両遺伝子のポリA付加シグナルの機能を欠失しない範囲であることを特徴とする請求項22ないし請求項24いずれか1項記載の組換えDNAウイルスの製造方法。

【請求項26】 リコンビナーゼが大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼCreである請求項22ないし請求項25いずれか1項記載の組換えDNAウイルスの製造方法。

【請求項27】 リコンビナーゼ認識配列がリコンビナーゼCreの基質となるloxPのDNA配列（配列番号：1）である請求項22ないし請求項26いずれか1項記載の組換えDNAウイルスの製造方法。

【請求項28】 DNAウイルス（b）が外来遺伝子を有することを特徴とする請求項22ないし請求項27いずれか1項記載の組換えDNAウイルスの製造方法。

【請求項29】 DNAウイルス（b）がさらに外来遺伝子の発現を制御するプロモーターを有することを特徴とする請求項28記載の組換えDNAウイルスの製造方法。

【請求項30】 外来遺伝子および外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが左向きに組み込まれていることを特徴とする請求項29記載の組換えDNAウイルスの製造方法。

【請求項31】 ベクター（a）およびDNAウイルス（b）のアデノウイルスゲノムがE1A遺伝子領域を含む1.3～9.3%断片を欠失していることを特徴とする請求項24ないし請求項30いずれか1項記載の組換えDNAウイルスの製造方法。

【請求項32】 DNAウイルス（b）のE1A遺伝子領域の欠失している部位に、外来遺伝子および外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが挿入されていることを特徴とする請求項31記載の組換えDNAウイルスの製造方法。

【請求項33】 DNAウイルス（b）のアデノウイルスゲノムがさらにE3遺伝子領域を含む79.6～84.8%断片を欠失していることを特徴とする請求項32記載の組換えDNAウイルスの製造方法。

【請求項34】 外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクチンプロモーター、ウサギβグロビンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター（CAGプロモーター）であることを特徴とする請求項29ないし請求項33いずれか1項記載の組換えDNAウイルスの製造方法。

【請求項35】 ベクター（a）およびDNAウイルス（b）のE1A遺伝子の機能が欠失され、動物細胞株がE1A遺伝子を発現している動物細胞株である、請求項22記載の組換えDNAウイルスの製造方法。

【請求項36】 E2A遺伝子の終止コドンとL3遺伝

子の終止コドンの間に、外来遺伝子が挿入されたことを特徴とする動物細胞感染用の組換えアデノウイルス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は動物細胞感染用の組換えDNAウイルスおよびその製造方法に関する。さらに、該組換えDNAウイルスの製造に用いられる、リコンビナーゼの認識配列をコードするDNA配列を含む組換えDNAウイルスベクターに関する。

【0002】

【従来の技術・発明が解決しようとする課題】これまで遺伝子導入のウイルスベクターとしてレトロウイルスが良く用いられたが、このウイルスは分裂している細胞にしか導入できないことや宿主細胞の染色体に組み込まれてしまうことにより、特に遺伝子治療においてはその安全性の観点より問題があり、その応用範囲は限られていると考えられている。アデノウイルスベクターは、種々の動物培養細胞で100%近い導入効率を示すこと、またレトロウイルスと異なり積極的な染色体組み込みの機構を持たないこと、さらに、休止期の細胞でも遺伝子導入出来るという利点もあり、外来遺伝子導入実験のベクターとしての応用範囲は極めて広く、近い将来は遺伝子治療の主要技術の一つとして確立するであろうと考えられている。

【0003】アデノウイルスベクターの利用は遺伝子治療技術の一つとして、また神経系などの高度に分化した細胞での発現研究の面で急速に普及してきている。遺伝子治療技術としては、既に構築され機能している組織へ直接投与することにより機能を担っている生細胞へ直接欠損した遺伝子を補う、いわゆる in vivo 遺伝子治療の方法として研究が精力的に進められている。既に嚢胞性繊維症では、米国で5グループが実際に患者への実験治療を認められており、筋ジストロフィー症、家族性高コレステロール血症、また脳腫瘍等に対して活発に研究されるようになった。一方でアデノウイルスベクターは休止期の細胞へも遺伝子導入が可能であり、分化した細胞や、特に神経系への遺伝子導入方法として、初代培養や動物個体への遺伝子導入実験が注目されている。以上より、アデノウイルスベクターは、神経系を含む多くの分化、未分化細胞への遺伝子治療導入だけでなく、動物個体への直接注入・投与による遺伝子発現が可能であることから、特に遺伝子治療への応用が期待されている。

【0004】しかし、アデノウイルスはレトロウイルスと異なり、積極的な染色体組み込みの機構を持たないことから、発現が一時的である。その期間は1～2週間から、長くて2ヶ月程度である。そのため治療効果を継続させる必要がある場合には、なるべく長期間細胞内でアデノウイルスが安定に存在し、アデノウイルス中に挿入された外来遺伝子の発現産物を産生し続けることが望ましい。そして、最近、アデノウイルスゲノムのE2A

遺伝子領域の存在がアデノウイルスの細胞内安定性に悪影響を及ぼしていることが分かってきた。従って、本発明の目的は、動物細胞内に導入されたアデノウイルスベクターが、細胞内でより安定に存在し、外来遺伝子産物を産生し続け得る組換えアデノウイルスベクターの系を構築することにある。さらに、かかる系を遺伝子治療用に提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者らは、上記の問題を解決するために鋭意検討し、アデノウイルスE2A遺伝子領域とL3遺伝子領域の間に外来ヌクレオチドを導入し得る領域が存在することを発見した。この領域には常法によりそのまま外来ヌクレオチドを導入することができるが、一旦適当なリンカーを常法により導入して必要な制限酵素部位を導入した後外来ヌクレオチドを導入してもよい。外来ヌクレオチドとしては、動物細胞に感染させた後その細胞内で発現することが望まれるポリペプチドをコードする外来遺伝子でもよく、またその外来ヌクレオチドがそのまま細胞中に共存する酵素の基質となるものであってもよい。さらに、本発明者らは、上記の領域に外来ヌクレオチドとしてリコンビナーゼの認識配列を導入することにより、動物細胞内で発現しうるリコンビナーゼ遺伝子を挿入した動物細胞感染用の組換えDNAウイルスベクターと併用すれば動物細胞内でアデノウイルスゲノムのE2A遺伝子領域を欠失させることができるようなアデノウイルスベクターの系を動物細胞感染用のDNAウイルスベクターとして構築できることを見出した。

【0006】ここに、リコンビナーゼとは、特異的なDNA組換え酵素で、数十塩基からなる特異的なDNA配列を認識し、この配列間でDNAの切断・鎖の交換と結合の全行程を行う。そこで、この酵素を発現する組換えアデノウイルスベクターと、E2A遺伝子領域の両側にこの認識配列を同じ向きに2コピーを持つ組換えアデノウイルスベクターを作製し、両方を細胞に共感染させると、発現したリコンビナーゼにより2つの認識配列間の再構成が起き、挟まれた部分が環状分子として切り出される。従って、こうして得られるE2A遺伝子領域を欠失したアデノウイルスベクターは、E2A遺伝子領域を含むアデノウイルスベクターに比して顕著に安定になり、遺伝子治療に有利に使用できると期待できる。

【0007】しかし、従来はE2A遺伝子領域の右側

(図1参照)すなわちE3領域内には外来DNA配列を導入できることが知られていたが、E2A遺伝子領域の左側には外来DNA配列を挿入できる部位の存在は知られていなかった。今回本発明者らにより、E2A遺伝子の終止コドンとL3遺伝子の終止コドンとの間に外来DNA配列を導入できる部位が存在することが発見された。これにより、初めてE2A遺伝子の機能を損なわずまたアデノウイルスの増殖の機能を保持したままE2A

遺伝子領域を挟んでリコンビナーゼ認識配列を導入できることが明らかにされたのである。本発明は、かかる知見に基づいて、さらに研究を進めて完成するに至ったものである。

【0008】即ち、本発明の要旨は、(1) 外来遺伝子及び外来遺伝子の発現を制御するプロモーターを有する、E2A遺伝子の機能が完全に欠失した動物細胞感染用の組換えDNAウイルス、(2) DNAウイルスがアデノウイルスである前記(1)記載の組換えDNAウイルス、(3) E2A遺伝子領域の一部または全部を欠失した前記(1)または(2)記載の組換えDNAウイルス、(4) 外来遺伝子及び外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが左向き(本来のE1A、E1B遺伝子の転写の向きと逆向きをいう。)に組み込まれていることを特徴とする前記(1)ないし(3)いずれか記載の組換えDNAウイルス、(5) アデノウイルスゲノムがE1A遺伝子領域を含む1.3~9.3%断片を欠失していることを特徴とする前記(2)ないし(4)いずれか記載の組換えDNAウイルス、(6) E1A遺伝子領域の欠失部位に外来遺伝子および外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが挿入されていることを特徴とする前記(5)記載の組換えDNAウイルス、

(7) アデノウイルスゲノムがさらにE3遺伝子領域を含む79.6~84.8%断片を欠失していることを特徴とする前記(6)記載の組換えDNAウイルス、

(8) 外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクチンプロモーター、ウサギβグロブリンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター(CAGプロモーター)であることを特徴とする前記(1)ないし(7)いずれか記載の組換えDNAウイルス、(9) E2A遺伝子領域の両側に位置する同方向を向いた二つのリコンビナーゼ認識配列を有する動物細胞感染用の組換えDNAウイルス、(10)

DNAウイルスがアデノウイルスである前記(9)記載の組換えDNAウイルス、(11) 二つのリコンビナーゼ認識配列の挿入部位の一方が、E2A遺伝子の終止コドンとL3遺伝子の終止コドンの間であって、両遺伝子のポリA付加シグナルの機能を欠失しない範囲であることを特徴とする前記(9)又は(10)記載の組換えDNAウイルス、(12) もう一方のリコンビナーゼ認識配列の挿入部位が、アデノウイルスゲノムの79.6~84.4%の範囲であることを特徴とする前記(11)記載の組換えDNAウイルス、(13) リコンビナーゼが大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼCreである前記(9)ないし(12)いずれか記載の組換えDNAウイルス、(14) リコンビナーゼ認識配列がリコンビナーゼCreの基質となる下記loxPのDNA配列(配列番号:1)

5' -ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT-3'

3'-TATTGAAGCATATCGTATGTAATATGCTCAATA-5'

である前記(9)ないし(13)いずれか記載の組換えDNAウイルス、(15) 外来遺伝子を有することを特徴とする前記(9)ないし(14)いずれか記載の組換えDNAウイルス、(16) 外来遺伝子の発現を制御するプロモーターを有することを特徴とする前記(15)記載の組換えDNAウイルス、(17) 外来遺伝子および外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが左向き(本来のE1A、E1B遺伝子の転写の向きと逆向きをいう。)に組み込まれていることを特徴とする前記(16)記載の組換えDNAウイルス、(18) アデノウイルスゲノムがE1A遺伝子領域を含む1.3~9.3%断片を欠失していることを特徴とする前記(10)ないし(17)いずれか記載の組換えDNAウイルス、(19) E1A遺伝子領域の欠失部位に外来遺伝子および外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが挿入されていることを特徴とする前記(18)記載の組換えDNAウイルス、(20) アデノウイルスゲノムがさらにE3遺伝子領域を含む79.6~84.8%断片を欠失していることを特徴とする前記(19)記載の組換えDNAウイルス、(21) 外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクチンプロモーター、ウサギβグロビンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター(CAGプロモーター)であることを特徴とする前記(16)ないし(20)いずれか記載の組換えDNAウイルス、(22) プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を組み込んだベクター(a)と、E2A遺伝子領域の両側に位置する同方向を向いた2つのリコンビナーゼ認識配列を有する組換えDNAウイルス(b)とを、動物細胞株へ導入し、2つのリコンビナーゼ認識配列間に存するE2A遺伝子領域を切除することからなる、E2A遺伝子の機能が完全に欠失した組換えDNAウイルスの製造方法、(23) DNAウイルス(b)がアデノウイルスである前記(22)記載の組換えDNAウイルスの製造方法、(24) さらにベクター(a)がアデノウイルスである前記(23)記載の組換えDNAウイルスの製造方法、(25) 2つのリコンビナーゼ認識配列の挿入部位の一方が、E2A遺伝子の終止コドンとL3遺伝子の終止コドンの間であって、両遺伝子のポリA付加シグナルの機能を欠失しない範囲であることを特徴とする前記(22)ないし(24)いずれか記載の組換えDNAウイルスの製造方法、(26) リコンビナーゼが大腸菌P1ファージ由来のリコンビナーゼCreである前記(22)ないし(25)いずれか記載の組換えDNAウイルスの製造方法、(27) リコンビナーゼ認識配列がリコンビナーゼCreの基質となるloxPのDNA配列(配列番号:1)である前記(22)ないし(26)いずれか記載の組換えDNAウイルスの製造方

法、(28) DNAウイルス(b)が外来遺伝子を有することを特徴とする前記(22)ないし(27)いずれか記載の組換えDNAウイルスの製造方法、(29)

DNAウイルス(b)がさらに外来遺伝子の発現を制御するプロモーターを有することを特徴とする前記(28)記載の組換えDNAウイルスの製造方法、(30)

外来遺伝子および外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが左向き(本来のE1A、E1B遺伝子の転写の向きと逆向きをいう。)に組み込まれていることを特徴とする前記(29)記載の組換えDNAウイルスの製造方法、(31) ベクター(a)およびDNAウイルス(b)のアデノウイルスゲノムがE1A遺伝子領域を含む1.3~9.3%断片を欠失していることを特徴とする前記(24)ないし(30)いずれか記載の組換えDNAウイルスの製造方法、(32) DNAウイルス(b)のE1A遺伝子領域の欠失している部位に、外来遺伝子および外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが挿入されていることを特徴とする前記(31)記載の組換えDNAウイルスの製造方法、(33) DNAウイルス(b)のアデノウイルスゲノムがさらにE3遺伝子領域を含む79.6~84.8%断片を欠失していることを特徴とする前記(32)記載の組換えDNAウイルスの製造方法、(34) 外来遺伝子の発現を制御するプロモーターが、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリβ-アクチンプロモーター、ウサギβグロビンのスプライシングアクセプターおよびポリA配列からなるハイブリッドプロモーター(CAGプロモーター)であることを特徴とする前記(29)ないし(33)いずれか記載の組換えDNAウイルスの製造方法、(35) ベクター(a)およびDNAウイルス(b)のE1A遺伝子の機能が欠失され、動物細胞株がE1A遺伝子を発現している動物細胞株である、前記(22)記載の組換えDNAウイルスの製造方法、並びに(36) E2A遺伝子の終止コドンとL3遺伝子の終止コドンの間に、外来遺伝子が挿入されたことを特徴とする動物細胞感染用の組換えアデノウイルス、に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】以下に本発明について詳細に説明する。本発明における動物細胞感染用のDNAウイルスベクターは、アデノウイルスのように細胞に感染後染色体外でしか存在し得ないようなDNAウイルス由来のベクターであれば、特に制限されることなく用いることができる。例えば、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、パポバウイルスベクター等が挙げられる。以下、リコンビナーゼ遺伝子又はリコンビナーゼ認識配列をもつ動物細胞感染用のDNAウイルスベクターの好適な例として、アデノウイルスベクターを用いて本発明を説明する。

【0010】本発明に用いられるアデノウイルスは、動物を自然宿主とするものであり、特にヒトを宿主とする

ヒトアデノウイルスが好適に用いられる。ヒトアデノウイルスのゲノムは、約 36 kbp の 2 本鎖線状 DNA であって、DNA 鎖両端にはおよそ 100 bp からなる逆方向反復塩基配列があり、その DNA 鎖両端の 5' 末端には E 2 B 遺伝子産物が切断加工された 55 k のタンパク質が共有結合しているという特異な構造をしている。

【0011】本発明に用いられるアデノウイルスのゲノムは、E 1 遺伝子領域特に E 1 A 遺伝子領域を欠失していることが好ましい。これは、アデノウイルスの細胞ガン化活性に関与する E 1 A 遺伝子領域を欠失させることにより、アデノウイルスを無毒化し、ゲノム中に組み込んだ外来の遺伝子配列のみを発現させるためである。必ずしも E 1 A 遺伝子領域の全てを欠失させる必要はないが、例えば 1.3~9.3% の断片を除去すれば、目的は達成される。また、本発明に用いられるアデノウイルスのゲノムは、E 3 遺伝子領域を欠失させてもよい。特に、E 3 遺伝子領域の 79.6~84.8% を欠失させたものが好ましい。アデノウイルスの複製には不要であるからである。したがって E 1 A、E 1 B 遺伝子を持続的に発現しているヒト胎児腎由来細胞株 (293 細胞) を除き、宿主細胞内で増殖することができないという特徴を有する。

【0012】しかしながら、実際にヒトや動物に投与した場合、E 1 A 蛋白と同様の機能を有する蛋白が細胞中に存在し、これによりわずかにアデノウイルス蛋白が発現する。これが細胞免疫を引起し、ウイルス DNA を保持する細胞が攻撃を受け排除されることがわかっている。現在使用されている E 1 A、E 1 B 欠損型アデノウイルスベクターによる遺伝子発現が短期間である原因はここにある。これを防ぐためには、E 2 A 遺伝子の機能を欠失させることが有効であることが Yang らにより明らかにされた (Nature Genetics, vol. 7, 362-369, 1993)。これは、温度感受性の E 2 A 遺伝子変異株を利用したものであるが、動物に投与した場合、E 2 A 遺伝子の機能発現が抑制されるものの機能発現を完全に止めることができない。E 2 A 遺伝子の機能発現を完全に止める手段としては E 2 A 遺伝子領域を欠失させることが考えられるが、E 2 A 遺伝子産物はアデノウイルスゲノムの複製に必須であるため、E 2 A 遺伝子を欠失したアデノウイルス自身は 293 細胞においても増殖できない。本発明は、E 2 A 遺伝子の両端にリコンビナーゼ認識配列を配置した組換えアデノウイルスとリコンビナーゼ発現用アデノウイルスを動物培養細胞に共感染させ、細胞内で発現したリコンビナーゼにより E 2 A 遺伝子欠失型感染性ウイルス粒子を作製するというものである。E 2 A 遺伝子産物は少なくともリコンビナーゼ発現用アデノウイルスから十分量補充される。得られる E 2 A 遺伝子欠失型ウイルスは E 2 A 遺伝子の発現が皆無であるため、目的とする遺伝子の発現期間が大幅に延長することは間違いない。

【0013】リコンビナーゼの認識配列の挿入位置は、E 2 A 遺伝子領域の右側には従来から知られている領域があるが、E 2 A 遺伝子領域の左側については、E 2 A 遺伝子の終止コドンと L 3 遺伝子の終止コドンの間であって、得られる組換えアデノウイルスの増殖を阻害しない部位が選択される。E 2 A 遺伝子領域や L 3 遺伝子領域の一部欠失あるいはポリ A 付加シグナル領域が一部欠失することになると、得られる組換えアデノウイルスの増殖が阻害されるため好ましくない。

【0014】本発明に用いられるプロモーターとしては、動物ウイルス遺伝子プロモーターおよび動物細胞遺伝子プロモーターが挙げられる。前者の例としては SV 40 遺伝子プロモーター、アデノウイルス主要後期遺伝子プロモーター等があり、また、後者の例としては、チミジンキナーゼ遺伝子プロモーター、メタロチオネイン遺伝子プロモーター、免疫グロブリン遺伝子プロモーター等がある。しかし本発明には、CAG プロモーターが特に有利に用いられる。このプロモーターは、サイトメガロウイルスエンハンサー、ニワトリ β -アクトチンプロモーター、ウサギ β グロビンのスプライシングアクセプターおよびウサギ β グロビン由来のポリ A 配列からなるハイブリッドプロモーターであり、高発現ベクターとして特開平 3-168087 号公報に開示されている。その調製は同公報に記載されている pCAGGS (特開平 3-168087、13 頁 20 行~20 頁 14 行および 22 頁 1 行~25 頁 6 行) から制限酵素 Sal I、Hind III で切り出すことにより行うことができ、本発明に利用することができる。

【0015】本発明に用いられるリコンビナーゼは、特異的な DNA 組換え酵素で、特定の塩基配列を認識し、この配列間で DNA の切断、鎖の交換と結合の全行程を行う。かかる酵素としては、大腸菌のバクテリオファージ P1 がコードするもの (リコンビナーゼ Cre) がある。これはバクテリオファージ P1 内の loxP (Abremski ら、J. Biol. Chem. 1984、1509-1514; および Hoess ら、P. N. A. S.、1984、81、1026-1029) 配列を基質とする。即ち、loxP 配列がリコンビナーゼ Cre の認識配列となる。また、他のリコンビナーゼとして酵母の 2 μ プラスミド由来の FLP 遺伝子がコードするリコンビナーゼが挙げられる (James R. Broarch ら、Cell、29、227-234)。さらに、チゴサッカロマイセス・ルーイの pSR1 プラスミド由来のものも使用できる。これは R 遺伝子にコードされる (Matsuzaki ら、Molecular and Cellular Biology、8、955-962 (1988))。これらの中では、バクテリオファージ P1 のリコンビナーゼが本発明に特に好適である。

【0016】リコンビナーゼ遺伝子は、例えば、リコンビナーゼ Cre 遺伝子の場合、バクテリオファージ P1 の DNA のリコンビナーゼ遺伝子をコードする部分をポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) 法を

用いて増幅して本発明に使用することができる。その他のリコンビナーゼ遺伝子の場合も同様にPCR法を用いて調製することができる。この場合に使用するプライマーは、リコンビナーゼ遺伝子の全配列がカバーされるように選択され、さらに組換えアデノウイルスベクターの構築の便宜のため、各プライマーの外側に適当な制限酵素切断配列を付加したものを使用することが好ましい。

【0017】上記のリコンビナーゼの認識配列（基質となる配列）は数十bpであり、例えばloxP配列は34bpであり、全て、塩基配列が知られているので（Abremskiら、J. Biol. Chem. 1984、1509-1514；およびHoessら、P. N. A. S.、1984、81、1026-1029）、常法により化学合成して本発明に使用することができる。

【0018】本発明に用いられるポリA配列としては、特に限定されるものでないが、ウサギβグロビン由来のものが特に好ましい。

【0019】本発明においては、リコンビナーゼ遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込む場合に、同時に核移行シグナル配列を組み込むことが好ましい。例えば、SV40の核移行シグナルが利用できる。これは、アデノウイルスベクターにより感染細胞の細胞質内で発現したリコンビナーゼがその認識配列を有するアデノウイルスベクターに作用するには、核内に移行する必要がある、核移行シグナル配列はこれを促進する（Daniel Kalderonら、Cell. 39、499-509（1984））からである。

【0020】本発明に使用される外来遺伝子としては、上記のハイブリッドプロモーター（CAGプロモーター）あるいはその他のプロモーターにより発現することができる遺伝子であれば、特に限定されるものではなく、有用性の観点から、ヒトの欠損遺伝子に対応する正常遺伝子の配列（例えばアデノシンデアミナーゼ、ジストロフィン、低密度リポ蛋白レセプター、α-1アンチトリプシン、血液凝固第8因子、血液凝固第9因子、ガラクトシダーゼα、もしくはβ）、サイトカイン類（例えばインターロイキン-1～12、インターフェロンα、βもしくはγ、腫瘍壊死因子αもしくはβ、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、エリスロポエチン、成長ホルモン、インシュリン、インシュリン様成長ホルモン）、神経栄養因子類、非自己抗原遺伝子（例えばアロHLA（HLA-B7））、ウイルス抗原等をコードするヌクレオチド配列、ガン抑制遺伝子（例えばp53、RB、WT-1、NM23、NF-1）、ガン遺伝子であるRas等のアンチセンス配列、またはチミジンキナーゼやシトシンデアミナーゼのような自殺遺伝子と呼ばれるものが挙げられる。

【0021】本発明の組換えアデノウイルスベクターに組み込まれるプロモーター、外来遺伝子およびポリA配列は上流からこの順に配向していても逆の順に配向していてもよい。

【0022】次に、本発明の組換えアデノウイルスの製造方法について説明する。

（1） まず、E2A遺伝子領域の両側にある同方向を向いた二つのリコンビナーゼ認識配列、プロモーター、外来遺伝子およびポリA配列を有する組換えアデノウイルスベクターの製造方法について述べる。便宜上、リコンビナーゼとしてはリコンビナーゼCreを、その認識配列としてはloxPを、プロモーターおよびポリA配列としては前記のCAGプロモーターを、外来遺伝子としてはLacZ遺伝子を使用する場合について述べるが、その他のリコンビナーゼ、その認識配列、プロモーターおよびポリA配列を使用する場合も実質的に同様の手法を利用することができる。

【0023】（a）（pAdex1CAwtの構築）

① CAGプロモーターを含むプラスミドpCMwCH31の構築

CAGプロモーターを含むプラスミドpCAGGS（Niwaら、Gene、108、193-200（1990））をEcoRIで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、SwaIリンカーとのリガーゼ反応を行う。次に、得られたプラスミドをSalIで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、ClaIリンカーとのリガーゼ反応を行う。さらに、得られたプラスミドをPstIで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、XhoIリンカーとのリガーゼ反応を行い、CAGプロモーターを含むプラスミドpCMwCH31を取得する。元の制限酵素部位の消失および各リンカーの挿入は各制限酵素切断の後、アガロースゲル電気泳動により確認する。

【0024】② pAdex1cの構築

実施例1②（i）～（vi）に記載の方法により構築する。その概要は以下のとおりである。E1遺伝子領域を欠失したアデノウイルスゲノム左側末端の17%を含むプラスミド（pUAF0-17D）、5型アデノウイルスDNAにBamHIリンカーを結合させた後HindIII消化して得られるフラグメント（2.8kb、アデノウイルスゲノムの左側末端の8%に当たる）をpUC19に挿入して得られるプラスミド（pUAF0-8）、およびアデノウイルスDNAをHindIII消化して得られる3.4kbフラグメント（アデノウイルスゲノムの左側末端の8-17%に当たる）をpUC19のHindIII部位へ挿入して得られるプラスミド（pUAF8-17）とを調製し、ついでpUAF0-8由来の454bpのBamHI-ClaIフラグメントと、pUAF8-17由来の2.9kbのHindIII-ClaIフラグメントをつなぎ、pUC19のBamHI/HindIII部位へ挿入してpUAF0-17Dを得る。

【0025】さらに、5型アデノウイルスDNAをBst1107とEcoRIで消化し21.6kbのフラグメントを得る。また、アデノウイルスゲノム由来のpX2WのEcoRI-SalIフラグメント（6.5k

b) を調製する。一方、charomid9-11 (I. Saito & G. Stark, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 83, p8664-8668, 1986) を *Asp* 718 と *Bam*HI で消化し、*Klenow* 酵素で平滑化後、セルフライゲーションする。ついでその *Eco*RI 部位へ *Bam*HI リンカーを挿入し、シャロミドを *chdRBR*7-11 を調製する。

【0026】上記の *pUAF*0-17D の *Bam*HI-*Bst*1107 フラグメント (2.9 kb) とアデノウイルスゲノムの *Bst*1107-*Eco*RI フラグメント (21.6 kb) と *pX2W* の *Eco*RI-*Swa*I フラグメント (6.5 kb) を *Eco*RI と *Ecl*36I で消化した *chdRBR*7-11 とライゲーションする。その後、*in vitro* パッケージングし、DH5 α へ感染させる。形質転換株から目的のフラグメントをもつものを単離し、*pAdex*1c と名づける。

【0027】③ カセットコスミド *pAdex*1cw の構築

*Cla*I で切断した後エタノール沈澱により回収した *pAdex*1c と、5' 末端リン酸化を施した下記の合成リンカー (1) (配列番号: 2) (*Swa*I、*Cla*I、*Sal*I、*Nru*I 部位を含む) を混合し、ATP、T4DNAリガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。リガーゼを熱失活させた後、*Swa*I で消化する。この切断はリンカーが複数個挿入されたものから *Swa*I 断片を切り出し、リンカーが1個のみ挿入された構造のコスミドを得るために行う。次に、反応液を *Spin* column (Pharmacia 社製) にかけて、リンカー由来の小断片を除去した後、T4DNAリガーゼでライゲーションを行い、セルフアニーリングによる環状化を行う。ついでイン・ビトロ・パッケージングを行い、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造を *Bam*HI および *Nru*I 同時消化により確認する。目的とする方向に挿入された場合 483 bp、逆方向に挿入された場合、464 bp の断片を生じる。この確認により目的とするカセットコスミド *pAdex*1cw (図1) を取得する。

合成リンカー

(1) 5'-CGATTTAAATCGATTGTCGACTCGCGA-3'
3'-TAAATTTAGCTAACAGCTGAGCGCTGC-5'

【0028】④ カセットコスミド *pAdex*1pCAw の構築

① で構築したプラスミド *pCMwCH*31 を *Hind*III および *Cla*I で同時消化し、*Klenow* 酵素により平滑化し、5' 末端リン酸化を施した *Pme*I リンカーとのライゲーションを行う。リガーゼを熱失活させた後、*Psp*1406I で消化する。この切断はリンカーが複数個挿入されたものから *Psp*1406I 断片を切り出し、リンカーがDNA断片の両端にそれぞれ1個連結した構造の断片を得るために行う。このあと、反応液

をアガロースゲル電気泳動に供し、2.3 kb のDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。次に、*pAdex*1cw を *Cla*I で切断した後、生じた小断片を *Spin* column (Pharmacia 製) により除去した後のDNA断片と前述の2.3 kb のDNA断片をT4DNAリガーゼでライゲーションさせる。リガーゼを熱失活させた後、*Cla*I を添加し、セルフアニーリングにより生じた環状コスミドを切断する。ついで、イン・ビトロ・パッケージングに用いる。更に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造を *Bam*HI および *Xho*I 同時消化により確認する。目的とする方向に挿入された場合 483 bp と 4.8 kb、逆方向に挿入された場合、2.7 及び 2.5 kb の断片を生じる。この確認により目的とするカセットコスミド *pAdex*1pCAw を取得する。

【0029】⑤ カセットコスミド *pAdex*1CAwt (細胞工学、Vol. 13, No. 8, P759) の構築

*Swa*I で切断した後エタノール沈澱により回収した *pAdex*1pCAw を、5' 末端リン酸化を施した下記の合成リンカー (2) (配列番号: 3) (*Cla*I、*Xba*I、*Spe*I、*Pac*I、*Swa*I、*Cla*I 部位を含む) を混合し、ATP、T4DNAリガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。リガーゼを熱失活させた後、*Pac*I (20 unit) を添加し、反応させる。この切断はリンカーが複数個挿入されたものから *Pac*I 断片を切り出し、リンカーが1個のみ挿入された構造のコスミドを得るために行う。次に、反応液を *Spin* column (Pharmacia 製) にかけて、リンカー由来の小断片を除去した後、T4DNAリガーゼを含む反応液中で一晩結合させ、セルフアニーリングによる環状化を行う。リガーゼを熱失活させた後、イン・ビトロ・パッケージングに用いる。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造を *Xba*I および *Xho*I 同時消化により確認する。目的とする方向に挿入された場合 552 bp、逆方向に挿入された場合、568 bp の断片を生じる。これを確認することにより目的とするカセットコスミド *pAdex*1CAwt (図2) を取得する。

40 合成リンカーの構造

(2) 5'-ATCGATTCTAGACTAGTTTAATTAATTTAAATCGAT-3'
3'-TAGCTAAGATCTGATCAAATTAATTAATTTAGCTA-5'

【0030】(b) (1oxP 挿入コスミドの構築その1)

*pAdex*2L3LCAwt の作製

① *pA60X99X* の作製

*pAdex*1CAwt を *Bam*HI で切断した後、熱処理により *Bam*HI を失活させる。次にT4DNAリガーゼにより一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5 α (GIBCO BRL 製) を形質転換

15

し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpA60X99Xを得る。

【0031】② pA60X99の作製（アデノウイルス以外のXbaI部位の除去）

pA60X99XをXbaI処理し、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、2ヶ所のXbaI部位のうち1ヶ所のみで切断された23.8kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。次に、この断片をKlenow酵素（宝酒造製）で両末端を平滑化し、T4DNAリガーゼで一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製する。これらのプラスミドDNAをBsrGIおよびXbaIで同時消化し、6.2kbの断片すなわちプラスミドpA60X99（図3）を得る。

【0032】③ pA2L60X99の作製（BsrGI部位へのloxPの挿入）

pULL2rをXhoIで切断した後、Klenow酵*

5'-CGAACGCGTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTCGAGTCG-3'
3'-GCTTGCATATTGAAGCATATCGTATGTAATATGCTTCAATAGAGCTCAGC-5'

（下線部分の配列がloxP部位である。）

【0034】一方、プラスミドpA60X99（10μg）をBsrGI（50unit）を含む反応系50μl中で切断した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、23.8kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。このDNA断片と前述のloxPを含む64bpのDNA断片、ATPおよびT4DNAリガーゼを含むリガーゼ反応液中で一晩結合させる。これに滅菌水、BsrGI反応bufferを加え、70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、BsrGIで処理してセルフアニーリングにより生じた環状のpA60X99を切断する。次いでこの反応混液10μlを用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製する。

【0035】挿入されたloxPの方向を確認するため、ApaIとMluIの同時消化を行い、反応混液をアガロースゲル電気泳動する。目的とする方向に挿入された場合、366および219bp、逆方向に挿入された場合、334および251bpの断片が生じる。また、NruIで消化した場合、目的とする方向に挿入された場合573bp、逆方向に挿入された場合、533bpの断片が生じる。さらに、DraIとKpnIで同時消化した場合、目的とする方向にloxPが1つ挿入された場合320bp、2つ挿入された場合、384bpの断片が生じる。これら3種の条件をすべて満たす、すなわち、目的とする方向にloxPが1つ挿入された目的のプラスミドpA2L60X99（図4）を取得する。

【0036】④ pA2L3L6099の作製（Xba

16

* 素（宝酒造製）で両末端を平滑化する。その後フェノール：クロロホルム（1：1）処理を施した後、エタノール沈澱する。沈澱物を遠心分離により取得し、TE60μlに溶解する。これと5'末端リン酸化KpnIリンカー（宝酒造製）、ATPおよびT4DNAリガーゼを含むリガーゼ反応液（最終容量50μl）中で一晩結合させる。次に、Asp718（ベーリングー製）で消化する。反応混液をアガロースゲル電気泳動し、loxPを含む64bpのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。

【0033】なお、上記のpULL2rは以下のようにして調製する。pUC119（宝酒造製）を制限酵素Ecl136IIで切断し、アルカリホスファターゼ処理を施した後、末端にMluI部位およびXhoI部位を有しこれが連結するとNruI部位を生じるように設計されているloxP配列を含む下記の合成DNA断片（配列番号：4）とのligation反応を行い該合成DNA断片が2つ挿入されたプラスミドpULL2rを得る。

I部位へのloxPの挿入）

pULL2rをXhoIを含む反応系100μl中で切断した後、Klenow酵素（宝酒造製）で両末端を平滑化する。ついで、フェノール：クロロホルム（1：1）処理を施した後、エタノール沈澱する。沈澱物を遠心分離により取得し、TEに溶解する。これと5'末端リン酸化SpeIリンカー（宝酒造製）、ATPおよびT4DNAリガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。さらに、SpeIを加え消化した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、loxPを含む64bpのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。

【0037】一方、pA2L60X99を、XbaIで切断した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、23.8kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNAを回収する。このDNA断片と前述のloxPを含む64bpのDNA断片、ATPおよびT4DNAリガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。リガーゼを熱失活させ、ついでこれをXbaIで処理し、セルフアニーリングにより生じた環状のpA2L60X99を切断する。この反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製する。

【0038】挿入されたloxPの方向を確認するため、BglIIとMluIの同時消化を行い、反応混液をアガロースゲル電気泳動する。目的とする方向に挿入された場合、366および503bp、逆方向に挿入された場合、398および471bpの断片が生じる。また、ApaIとMluIで同時消化した場合、目的とする方向に挿入された場合660bp、逆方向に挿入され

た場合、628bpの断片が生じる。EcoNIとMluIで消化した場合、目的とする方向に挿入された場合311bp、逆方向に挿入された場合、343bpの断片が生じる。さらに、HpaIとSacIで同時消化した場合、目的とする方向にloxPが1つ挿入された場合397bp、2つ挿入された場合、461bpの断片が生じる。これら4種の条件をすべて満たす、すなわち、目的とする方向にloxPが1つ挿入された目的のプラスミドpA2L3L6099(図5)を取得する。

【0039】⑤ pAdex2L3LCAwtの作製
pAdex1CAwtを、Csp45I(東洋紡製)で切断し、次いで、同反応液中でBamHI、さらにEcoRIで切断した後、アガロースゲル電気泳動によるチェックを行う。21kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。なお、Csp45IおよびEcoRIによる切断は21kbのBamHIDNA断片を回収する際、他の断片が混入するのを防ぐためである。

【0040】pA2L3L6099をBamHIで切断した後、フェノール:クロロホルム(1:1)処理を施し、水層をTEで平衡化したSephadexG25によりゲル濾過する。回収したDNA断片と前述の21kbのDNA断片、ATPおよびT4DNAリガーゼを含む反応液中で一晩結合させる。リガーゼを熱失活させた後、これをイン・ビトロ・パッケージングに用いる。

【0041】即ち、ラムダ・イン・ビトロ・パッケージングキットであるギガバックXL(Stratagene製)を用い、残りは-80℃に凍結する。ギガバックXLは42kb以下のコスミドのパッケージ効率が低いのでインサートが入って大きくなったコスミドをある程度選択することができる。本発明では、10個のコロニーを拾えば大半はインサートを含んでおり、目的のクローン(ウイルスゲノムが正しく連結されたクローン)を容易に得ることができる。コスミドの扱い方については、常法(斎藤 泉他、実験医学:7:183-187,1989)に従って行う。

【0042】パッケージングされたコスミドを大腸菌DH5α(GibcoBRL製)に感染させる。即ち、A*

5'-CATGTAATTT AAATCTCGAG ATAACCTTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTATACGCGT
3'-ATTAAA TTTAGAGCTC TATTGAAGCA TATTACATAC GATATGCTTC AATATGCGCA
ATTTAAATGT AAAAATAATG TACTAGAGAC ACTTCAATA AAGGCAATG CTTTTATTT-3'
TAAATTTACA TTTTATTAC ATGATCTCTG TGAAAGTTAT TTCCGTTTAC GAAAAATAAC ATG-5'

【0045】③ pA2LA3L6099の作製
p2LA6065をBamHIおよびSfiI(あるいはBglI)により切断し、1.5kbの断片を調製する。また、pA2L3L6099をBamHIおよびSfiIにより切断し、約22kbの断片を調製する。次に両断片をリガーゼ反応buffer中に加え、さらにATP、T4DNAリガーゼを加え、一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換

* p⁺(アンピシリン添加)寒天プレートとAp⁺LB(pool)に各種の濃度で接種し、一晩培養する。poolのminiprepDNAを抽出・調製し、制限酵素DraI切断によりインサートがはいったものの割合を調べる。コロニーは丸ごと寒天ごと取りAp⁺LBで一晩培養し、miniprepDNAを調製する。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をDraI切断により確認する。目的とする方向に挿入された場合891bp、逆方向に挿入された場合1.4kbの断片を生じる。これにより目的とするカセットコスミドpAdex2L3LCAwtを取得する。

【0043】(c)(loxP挿入コスミドの構築その2)

pAdex2LA3LCAwtの作製

① pUCA6065の作製

pA60X99をBamHIおよびPstIにより切断し、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、BsrGI部位を含む1.7kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。同様の操作によりpUC19をBamHIおよびPstIにより切断し、2.7kbの断片を回収する。次に両断片をリガーゼ反応buffer中に加え、さらにATP、T4DNAリガーゼを加え、一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpUCA6065を得る。

【0044】② p2LA6065の作製

pUCA6065をBamHIおよびAflIIIで切断し、780bpの断片を調製し、また、同プラスミドをBamHIおよびBsrGIで切断し、3.6kbの断片を調製する。これら両断片とloxP配列を含む下記のリンカーDNA(配列番号:11)を混合しリガーゼ反応buffer中に加え、さらにATP、T4DNAリガーゼを加え、一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、リンカーDNAが1つ挿入された、目的とするプラスミドp2LA6065を得る。

し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpA2LA3L6099を得る。

【0046】④ pAdex2LA3LCAwtの作製
pAdex2L3LCAwt作製の際の⑤と同様の操作により、pA2LA3L6099とpAdex1CAwtからpAdex2LA3LCAwtを作製する。

【0047】(d)(loxP挿入コスミドの構築その

3)

pAdex2LD3LCAwtの作製

① pHSGA6065の作製

pA60X99をBamHIおよびPstIにより切断し、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、BsrGI部位を含む1.7kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収する。pHSG299（宝酒造）をBamHIおよびPstIにより切断し、同様の操作により2.7kbの断片を回収する。次に両断片をリガーゼ反応buffer中に加え、さらにATP、T4DNAリガーゼを加え、一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNA*

5'-GTACACTCTC GGGTGATTAT TTACCCCCAC CCTTGCCGTC TGCGCCGATT TAAATCTCGA
3'-TGAGAG CCCACTAATA AATGGGGGTG GGAACGGCAG ACGCGGCTAA ATTTAGAGCT
GATAACTTCG TATAATGTAT GCTATACGAA GTTATACGCG TATTTAAATC CGTTT-3'
CTATTGAAGC ATATTACATA CGATATGCTT CAATATGCGC ATAAATTTAG GCAAA-5'

【0049】③ pA2LD3L6099の作製

p2LD6065をBamHIおよびSfiI（あるいはBglI）により切断し1.5kbの断片を調製する。また、pA2L3L6099をBamHIおよびSfiIにより切断し、約2.2kbの断片を調製する。次に両断片をリガーゼ反応buffer中に加え、さらにATP、T4DNAリガーゼを加え、一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpA2LD3L6099を得る。

【0050】④ pAdex2LD3LCAwtの作製
pAdex2L3LCAwt作製の際の⑤と同様の操作により、pA2LD3L6099とpAdex1CAwtからpAdex2LD3LCAwtを作製する。

【0051】(e) アデノウイルスDNA-末端蛋白複合体(Ad5 d1X DNA-TPCおよびAdex1CANLacZ DNA-TPC)の調製

① アデノウイルスDNAとしては、Ad5 d1X (I. Saito et al., J. Virology, vol. 54, 711-719 (1985))またはAdex1CANLacZを用いる。Ad5 d1XをHeLa細胞(Roux 10本分)に、Adex1CANLacZを293細胞にそれぞれ感染させ、培養を行う。即ち、Ad5-d1XまたはAdex1CANLacZのウイルス液(〜10⁹ PFU/ml)を0.2ml/Roux感染させ、3日後に、はがれた細胞を遠心分離により集める。アデノウイルス粒子のほとんどはメディアウム中ではなく細胞の核内にあるので感染細胞からウイルスを精製できる利点がある。(以下の操作は非無菌的に行う。)

【0052】② 得られた細胞をTris-HCl(pH8.0)に懸濁し、密封型ソニケーターを用いて細胞を破碎し、ウイルスを細胞内から放出させる。

* Aを調製し、目的とするプラスミドpHSGA6065を得る。

【0048】② p2LD6065の作製

pHSGA6065をBsrGIおよびDraIで切断し4.4kbの断片を調製し、これとloxP配列を含む下記のリンカーDNA（配列番号：12）を混合し、リガーゼ反応buffer中に加え、さらにATP、T4DNAリガーゼを加え、一晩結合させる。次いでこの反応混液を用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、リンカーDNAが1つ挿入された目的とするプラスミドp2LD6065を得る。

③ 得られた破砕物を遠心分離により沈澱を除いた後、超遠心分離機 SW28チューブに塩化セシウム溶液（比重1.43）を入れ、その上に上清を重層し、クッション遠心による濃縮を行う。

④ 界面直下のウイルス層をSW50.1チューブに移す。界面直下のウイルス層は通常目視でき、ウイルス層とその下層の塩化セシウムを5ml採取する。同時にもう一本に塩化セシウム溶液（比重1.34）を満たす。これらを、35krpm、4℃で一晩超遠心にかけた。次いで、白いウイルスのバンドを分取し、既に勾配ができたチューブに乗せ替える。さらに、35krpm、4℃4時間以上超遠心にかける。

【0053】⑤ 白いウイルスのバンドを分取し、等量の8M塩酸グアニジンと室温で混合し、4M塩酸グアニジン飽和塩化セシウムを加えてVTi65チューブに満たす。4M塩酸グアニジンにより、粒子蛋白は変性を受けて解離し、DNA-TPCが放出される。

【0054】⑥ 上記のチューブを、55krpm、15℃で一晩超遠心にかける。0.2mlずつ分画し、その1μlずつを1μg/mlのエチジウムブロミド水溶液20μlと混合し、蛍光染色することによりDNAの有無を確認する。DNAを含む2〜3フラクションを集める。

⑦ 500mlのTEに一晩透析（2回）し、-80℃に保存した。こうして得られたAd5d1X DNA-TPCまたはAdex1CANLacZ DNA-TPCの量をOD₂₆₀から通常のDNAと同様に算出する。

⑧ 得られたAd5d1X DNA-TPCまたはAdex1CANLacZ DNA-TPCを、次のステップのloxP挿入組換えアデノウイルス作成のため、充分量のAgeIで2時間切断し、Sephadex G25カラムでゲル濾過後、-80℃に保存する。

【0055】(f) loxP挿入組み換えアデノウイルス

スの作製

なお、NLacZは大腸菌LacZ遺伝子のN末端にSV40の核移行シグナルを付加したものである。

① 10%FCS添加DMEで培養した293細胞の6cm、10cmシャーレ各1枚用意する。

②-1. (Ad5d1X2L3LまたはAdex2L3LCANLacZの作製)

発現ユニットを組み込んだloxPを挿入したコスミドpAdex2L3LCAwt DNAの8μgとAgeIで切断したAd5d1X DNA-TPCまたはAgeIで切断したAdex1CANLacZ DNA-TPCの1μgを混合し、セルフェクト(ファルマシア製)キットを用いて、6cmシャーレ1枚にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行う。6cmシャーレのメディウムの上から混合液を滴下し、培養を続ける。一晚培養(約16時間)し、午前中に培養液を交換し、夕方、コラーゲンコート96穴3枚(原液・10倍希釈・100倍希釈)に、5%FCS添加DMEを用い、各ウエル当たり0.1mlでまき直す。細胞数が各プレートで大きく変わらないように、希釈2枚分には10cmシャーレの293細胞を1/3ずつ混ぜて播く。

【0056】②-2. (Ad5d1X2LA3LまたはAdex2LA3LCANLacZの作製)

発現ユニットを組み込んだloxPを挿入したコスミドpAdex2LA3LCAwt DNAの8μgとAgeIで切断したAd5d1X DNA-TPCまたはAgeIで切断したAdex1CANLacZ DNA-TPCの1μgを混合し、セルフェクト(ファルマシア製)キットを用いて、6cmシャーレ1枚にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行う。6cmシャーレのメディウムの上から混合液を滴下し、培養を続ける。一晚培養(約16時間)し、午前中に培養液を交換し、夕方、コラーゲンコート96穴3枚(原液・10倍希釈・100倍希釈)に、5%FCS添加DMEを用い、各ウエル当たり0.1mlでまき直す。細胞数が各プレートで大きく変わらないように、希釈2枚分には10cmシャーレの293細胞を1/3ずつ混ぜて播く。

【0057】②-3. (Ad5d1X2LD3LまたはAdex2LD3LCANLacZの作製)

発現ユニットを組み込んだloxPを挿入したコスミドpAdex2LD3LCAwt DNAの8μgとAgeIで切断したAd5d1X DNA-TPCまたはAgeIで切断したAdex1CANLacZ DNA-TPCの1μgを混合し、セルフェクト(ファルマシア製)キットを用いて、6cmシャーレ1枚にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行う。6cmシャーレのメディウムの上から混合液を滴下し、培養を続ける。一晚培養(約16時間)し、午前中に培養液を交換し、夕方、コラーゲンコート96穴3枚(原液・10倍希釈・100倍希釈)に、5%FCS添加DMEを用

い、各ウエル当たり0.1mlでまき直す。細胞数が各プレートで大きく変わらないように、希釈2枚分には10cmシャーレの293細胞を1/3ずつ混ぜて播く。

【0058】③ 3~4日後と8~10日後に、各ウエルに50μlの10%FCS添加DMEを加える。293細胞がやせてきたら早めに加える。ウイルスが増殖し細胞が死滅したウエルが7~20日の間に現れる。ウエルの細胞が完全に死滅するごとに滅菌パスツールピペットで培養液(死細胞ごと)を滅菌した1.5mlチューブに無菌的に移して、ドライアイスで急凍して-80℃に保存する。

④ 15~25日で判定は終了する。比較的遅く細胞が死んだウエルから回収した培養液チューブを約10個選び、超音波破碎後、5000rpm10分遠心して得られた上清を1次ウイルス液(first seed)として-80℃に保存する。早めにウイルス増殖が起こったウエルは複数のウイルス株の混合感染の可能性が高いからである。

【0059】⑤ 24穴プレートに293細胞を用意し、5%FCS-DME(0.4ml/ウエル)と1次ウイルス液10μlをそれぞれ2ウエルずつ添加する。

⑥ 約3日で細胞が完全に死滅したら、1ウエルは1次ウイルス液作製と同様に超音波破碎と遠心分離で上清を得、これを2次ウイルス液(second seed)として-80℃に保存する。他の1ウエルの死滅した細胞を5000rpmで5分間遠心し、上清を捨てて細胞だけを-80℃に保存する(セルパック)。10種類のウイルス株のセルパックが集まったら以下の方法で感染細胞の全DNAを抽出する。セルパックには、400μlのcell DNA用TNE(50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 10mM EDTA)、4μlのproteinaseK(10mg/ml)および4μlの10%SDSを加える。

【0060】⑦ 50℃で1時間処理した後、フェノール・クロロホルム抽出2回、クロロホルム抽出2回、ついでエタノール沈澱により得られた核酸をRNAseを20μg/ml含む50μlのTEに溶かす。その15μlを発現ユニットを切断する酵素の中で認識配列にCGを含む酵素であるXhoIで切断し、発現コスミドカセットのXhoI切断と共に、15cm位の長さのアガロースゲルで一晩電気泳動を行い、パターンを比較する。XhoIは挿入したloxP配列内に認識部位があるので、loxPが2個挿入された切断パターンを示すクローンを選択する。説明できないバンドが薄く見えるクローンは、欠失のあるウイルスとの混合の可能性があるので廃棄する。

【0061】ここで得られるloxP挿入組換えアデノウイルスAd5d1X2L3L、Ad5d1X2LA3L、Ad5d1X2LD3L等と、目的の外來遺伝子発現ユニットを含むコスミドを用いて、公知の組換えアデノウイルス作製方法、例えばCOS-TPC法(「実験

医学別冊「バイオマニュアルシリーズ4、遺伝子導入と発現・解析法、43～58頁）に従って、目的の外来遺伝子発現ユニットとloxPが挿入された組換えアデノウイルスを作製することができる。

【0062】(g) E2A遺伝子欠損アデノウイルスの作製と構造確認

組み換えアデノウイルスAdex2L3LCANLacZおよびAdex1CANCReをそれぞれmoi=10および3で293細胞に感染させ、培養を行う。4日目に細胞を回収し、前述の方法によりDNAを調製する。loxPで挟まれた領域(E2A遺伝子を含む)が切り出された構造を有するAdexd123CANLacZの生成を2つの方法で確認する。なお、Adex2LA3LCANLacZおよびAdex2LD3LCANLacZに関しても同様の操作により構造が確認できる。

【0063】1. SmaI消化

SmaI消化の後、ゲル電気泳動した結果、loxPで挟まれた領域が切り出されて生ずる4.7kbの断片が認められる。このバンドとAdex2L3LCANLacZ、Adex1CANCRe、およびAdexd123CANLacZにおいて共通して見られる4.45kbのバンドの濃さの比較から、回収した組換えアデノウイルス中の約何%がAdexd123CANLacZであるかが分かる。

【0064】2. PCRによる確認

調製したDNA0.1ngをテンプレートとし、通常の条件でPCRを行い、生成物をアガロースゲル電気泳動により分析する。用いるプライマーは、下記に示すオリゴヌクレオチド(1)(配列番号:5)、オリゴヌクレオチド(2)(配列番号:6)、オリゴヌクレオチド(3)(配列番号:7)およびオリゴヌクレオチド(4)(配列番号:8)が好ましい。

(1) 5'-CAACTCCATGCTCAACAGTCC
CCAGGTACA-3'

(2) 5'-GATTTTTTAAACGGCGCAGACG
GCAAG-3'

(3) 5'-GTGAGCTTAGAAAACCTTAG
-3'

(4) 5'-AGATACCCCTTTTGCACTGGT
GCAAGTTAAC-3'

PCR反応液組成は、10mMのTris・HCl(pH8.3)中、50mMのKCl、1.5mMのMgCl₂、0.2mMのdNTP mixture および各0.2μMのプライマー、0.1ngのテンプレートDNAおよび0.5unitのTaqポリメラーゼを含むものが好ましい。PCR反応条件としては、二本鎖解離を95℃で1.5分、アニーリングを64℃で1.0分、伸長反応を70℃で1.0分、反応サイクル30回、が好ましい1例である。プライマーとして(1)と(4)を

用いた場合、393bpと推定されるバンドが検出され、E2A遺伝子が欠失したAdexd123CANLacZの存在が明らかとなり、また、(2)と(3)を用いた場合、221bpと推定されるバンドが検出され、Cre遺伝子産物により切り出された環状のE2A遺伝子の存在も裏付けられ、Adex2L3LCANLacZからloxPではさまれた領域(E2A遺伝子を含む)が切り出されたAdexd123CANLacZの生成が明らかになる(図6)。

10 【0065】(2) 次に、プロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する組換えアデノウイルスベクターの製造方法について説明する。以下に、リコンビナーゼ遺伝子としてリコンビナーゼCre遺伝子を使用した場合について述べるが、他のリコンビナーゼ遺伝子の場合もほぼ同様である。

【0066】① PCR法で調製したリコンビナーゼCre遺伝子およびプラスミドpUC19(宝酒造製)とをそれぞれ制限酵素PstI(宝酒造製)およびXbaI(宝酒造製)で同時消化したのち混合・ライゲーションし、リコンビナーゼCre遺伝子が組み込まれたプラスミドpUCCreを得る。

② CAGプロモーターを含むカセットコスミドpAdex1CAwtを制限酵素SwaI(Boehringer製)で処理したものと、pUCCreを制限酵素PstI(宝酒造製)およびXbaI(宝酒造製)で同時消化したのちKlenow酵素(宝酒造製)で両端を平滑化したものとを混合する。ついでカセットコスミドを沈殿させ、T4 DNAリガーゼで結合させ、リコンビナーゼCre遺伝子を組み込んだカセットコスミドを得る。

30 【0067】CAGプロモーター以外のプロモーターを使用する場合は、まず、アデノウイルスゲノム(36kb)の全長のうち、複製に不要なE3領域(1.9kb)とE1A・E1B領域(2.9kb)を欠失させた約31kbのゲノムDNAをもつカセットコスミドを作成し、他方、使用しようとするプロモーター、リコンビナーゼCre遺伝子およびポリA配列を含むプラスミドを作製し、適当な制限酵素で処理してアデノウイルスゲノムのE1A・E1B欠失部位にリコンビナーゼCre遺伝子発現ユニットを組み込んだカセットコスミドを得る。

③ 次に、得られたカセットコスミドを、ラムダ・インビトロ・パッケージングキットであるギガパックXL(Stratagene製)を用いて、インビトロ・パッケージングを行う。

【0068】④ 一方、アデノウイルスDNA-末端蛋白複合体(Ad5dIX DNA-TPC)を調製する。アデノウイルスDNAとしては、Ad5dIX(I. Saito et al., J. Virology, vol. 54, 711-719 (1985))を用い、Ad5dIXをHeLa細胞(Roux瓶10本分)に感染させ、培養を行う。ウイルス粒子を回

収し、塩酸グアニジン処理・超遠心によりDNA-TPCを分離・回収する。こうして得られたAd5dlX DNA-TPCを次のステップの組換えアデノウイルス作製のため充分量のEcoT22Iで処理する。

【0069】⑤ 最後のステップとして、リコンビナーゼCre遺伝子を組み込んだカセットコスミドとEcoT22Iで処理したAd5dlX DNA-TPCを混合し、セルフエクト（ファルマシア製）キットを用いてリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行う。ウイルスの増殖のため細胞が死滅したものからウイルス液を回収しプロモーター、リコンビナーゼ遺伝子およびポリA配列を有する組換えアデノウイルスベクターを得る。

【0070】本発明の方法により上記のようにして得られる、目的の外来遺伝子発現ユニットを有し、E2A遺伝子の機能が完全に欠失した本発明の組換えアデノウイルスの高力価ウイルス溶液は、適宜希釈して局所注入（中枢神経系・門脈など）、経口（腸溶剤を用いる）投与、経気道投与、経皮投与等の投与方法により共感染させ、遺伝病を含む各種疾患の治療に用いることができる。

【0071】

【実施例】以下、実施例、参考例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例等によりなら限定されるものではない。なお、実施例中のフェージ、プラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞などを取り扱う諸操作は、特に断らない限り、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual. T. Maniatis 編、第2版（1989）、Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行った。また、DNA制限酵素および修飾酵素は、宝酒造、New England Biolabs (NEB) 社、Stratagene社又はBoehringer社から購入し、製造者指示書に従って使用した。

【0072】実施例1（pAdex1CAwtの構築）

① CAGプロモーターを含むプラスミドpCMwCH31の構築

CAGプロモーターを含むプラスミドpCAGGS（Niwaら、Gene、108、193-200（1990））をEcoRIで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、SwaIリンカーとのリガーゼ反応を行った。次に、得られたプラスミドをSalIで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、ClaIリンカーとのリガーゼ反応を行った。さらに、得られたプラスミドをPstIで切断した後、Klenow酵素により平滑化し、XhoIリンカーとのリガーゼ反応を行った。元の制限酵素部位の消失および各リンカーの挿入は各制限酵素切断の後、アガロースゲル電気泳動により確認した。

【0073】② pAdex1cの構築

（i）E1遺伝子領域を欠失したアデノウイルスゲノム

左側末端の17%を含むプラスミド（pUAF0-17D）の調製

5型アデノウイルスDNAをS1処理して平滑末端とし、その平滑末端にBamHIリンカーを結合させ、その後HindIII消化し、目的のフラグメント（2.8kb、アデノウイルスゲノムの左側末端の8%に当たる）をアガロースゲル電気泳動で分離・回収し、BamHI/HindIII消化したpUC19のBamHI/HindIII部位へ挿入した。得られた目的のプラスミドをpUAF0-8と名づけた。

【0074】（ii）アデノウイルスDNAをHindIII消化し、アガロースゲル電気泳動で分離し、目的の3.4kbのフラグメント（アデノウイルスゲノムの左側末端の8-17%に当たる）をゲルから回収し、pUC19のHindIII部位へ挿入した（pUAF8-17と命名）。pUAF0-8の塩基番号（ここでいう塩基番号はアデノウイルスDNA由来）454番目のPvuII部位をClaIリンカーを用いてClaI部位に変換した。そして、このプラスミドをBamHI/ClaI消化し、454bpのBamHI-ClaIフラグメントをアガロースゲル電気泳動で回収した。pUAF8-17の塩基番号3328番目のBgIII部位をClaIリンカーを用いてClaI部位に変換した。そしてこのプラスミドをHindIII/ClaI消化し、2.9kbのHindIII-ClaIフラグメントをアガロースゲル電気泳動で回収した。pUAF0-8由来の454bpのBamHI-ClaIフラグメントと、pUAF8-17由来の2.9kbのHindIII-ClaIフラグメントをつなぎ、pUC19のBamHI/HindIII部位へ挿入した。得られたプラスミドをpUAF0-17Dと命名した。このプラスミドはE1遺伝子領域を欠失したアデノウイルスゲノム左側末端の17%を含む。

【0075】（iii）アデノウイルスゲノムのBst1107-EcoRIフラグメント（21.6kb）の調製
5型アデノウイルスDNAをBst1107とEcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した後、目的の21.6kbのフラグメントを回収した。

【0076】（iv）アデノウイルスゲノムのEcoRI-SalIフラグメント（6.5kb）の調製
pX2S（I. Saito et. al., J. of Virology, vol. 54, p711-719, 1985）のSalI部位をSwaIリンカー（メーカー名）を用いてSwaI部位へ変換しpX2Wを得た。pX2WをEcoRIとSwaIで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した後、目的の6.5kbのフラグメントを回収した。

【0077】（v）シャロミド（chdRBR7-11）の調製

charomid9-11（I. Saito & G. Stark, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 83, p8664-8668, 1986）のK

p n I、Sma I、BamH Iを除くため、charomid 9-11をAsp 718とBamH Iで消化し、Klenow酵素で平滑化後、セルフライゲーションした。これを用いて形質転換し、目的のシャロミドを単離し、charomid 6-11と名づけた。charomid 6-11のEcoR I部位へBamH Iリンカーを挿入し、得られたシャロミドをchdRBR 7-11と名づけた。

【0078】(vi) pAdex 1 cの調製

pUAF 0-17DのBamH I-Bst 1107フラグメント(2.9 kb)とアデノウイルスゲノムのBst 1107-EcoR Iフラグメント(21.6 kb)とpX2WのEcoR I-Swa Iフラグメント(6.5 kb)をEcoR IとEcl 36 Iで消化したchdRBR 7-11とライゲーションした。その後、in vitroパッケージングし、大腸菌DH5 α へ感染させた。形質転換株から目的のフラグメントをもつものを単離し、pAdex 1 cと名づけた。

【0079】③ カセットコスミドpAdex 1 cwの構築

Cla I (20 unit)で切断した後エタノール沈澱により回収したpAdex 1 c (1 μ g)と、5'末端リン酸化を施した下記の合成リンカー(1)(配列番号: 2) 0.01 μ g (Swa I、Cla I、Sal I、Nru I部位を含む)を混合し、ATP、T4 DNAリガーゼを含む反応液(最終容量18 μ l)中で一晩結合させた。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、Swa I (20 unit)を添加し、反応させた。この切断はリンカーが複数個挿入されたものからSwa I断片を切り出し、リンカーが1個のみ挿入された構造のコスミドを得るために行った。次に、反応液をSpin column (Pharmacia製)にかけ、リンカー由来の小断片を除去した後、ATP、T4 DNAリガーゼを含む反応液(最終容量18 μ l)中で一晩結合させ、セルフアニーリングにより環状化を行った。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させ、1 μ lをイン・ビトロ・パッケージングに用いた。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をBamH IおよびNru I同時消化により確認した。目的とする方向に挿入された場合483 bp、逆方向に挿入された場合、464 bpの断片を生じる。この確認により目的とするカセットコスミドpAdex 1 cw (図1)を取得した。

合成リンカー

(1) 5'-CGATTTAAATCGATTGTCGACTCGCA-3'
3'-TAAATTTAGCTAACAGCTGAGCGCTGC-5'

【0080】④ カセットコスミドpAdex 1 pCAwの構築

①で構築したプラスミドpCMwCH31をHind IIIおよびCla Iで同時消化し、Klenow酵素によ

り平滑化し、5'末端リン酸化を施したPme Iリンカーとのリガーゼ反応を行った。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、Psp 1406 Iを添加し、反応させた。この切断はリンカーが複数個挿入されたものからPsp 1406 I断片を切り出し、リンカーがDNA断片の両端にそれぞれ1個連結した構造の断片を得るために行った。このあと、反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、2.3 kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収した。次に、pAdex 1 cwをCla Iで切断した後、生じた小断片をSpin column (Pharmacia製)により除去した後のDNA断片1 μ gと前述の2.3 kbのDNA断片0.1 μ gをATP、T4 DNAリガーゼを含む反応液(最終容量18 μ l)中で一晩結合させた。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、これの1/4量にCla Iを添加し(最終容量20 μ l)、セルフアニーリングにより生じた環状コスミドを切断した。1 μ lをイン・ビトロ・パッケージングに用いた。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をBamH I及びXho I同時消化により確認した。目的とする方向に挿入された場合483 bpと4.8 kb、逆方向に挿入された場合、2.7および2.5 kbの断片を生じる。この確認により目的とするカセットコスミドpAdex 1 pCAwを取得した。

【0081】⑤ カセットコスミドpAdex 1 CAwの構築

Swa I (20 unit)で切断した後エタノール沈澱により回収したpAdex 1 pCAw (1 μ g)と、5'末端リン酸化を施した下記の合成リンカー(2)(配列番号: 3) (0.01 μ g) (Cla I、Xba I、Spe I、Pac I、Swa I、Cla I部位を含む)を混合し、ATP、T4 DNAリガーゼを含む反応液(最終容量18 μ l)中で一晩結合させた。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、Pac I (20 unit)を添加し、反応させた。この切断はリンカーが複数個挿入されたものからPac I断片を切り出し、リンカーが1個のみ挿入された構造のコスミドを得るために行った。次に、反応液をSpin column (Pharmacia製)にかけ、リンカー由来の小断片を除去した後、ATP、T4 DNAリガーゼを含む反応液(最終容量18 μ l)中で一晩結合させ、セルフアニーリングによる環状化を行った。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた1 μ lをイン・ビトロ・パッケージングに用いた。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をXba IおよびXho I同時消化により確認した。目的とする方向に挿入された場合552 bp、逆方向に挿入された場合、568 bpの断片を生じる。これを確認することにより目的とするカセットコス

ミドpAdex1CAwt (図2)を取得した。

合成リンカーの構造

(2) 5'-ATCGATTCTAGACTAGTTTAATTAATTTAAATCGAT-3'
3'-TAGCTAAGATCTGATCAAATTAATTAATTTAGCTA-5'

【0082】実施例2 (loxP挿入コスミドの構築)

① pA60X99Xの作製

pAdex1CAwt (0.5μg)をBamHI (15unit)を含む反応系20μl中で切断した後、熱処理(70℃、15分間)によりBamHIを失活させた。次にその1/4量を用いリガーゼ反応buffer中でATP、T4DNAリガーゼを加え、最終容量20μlで一晩結合させた。次いでこの反応混液10μlを用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製し、目的とするプラスミドpA60X99Xを得た。

【0083】② pA60X99の作製 (アデノウイルス以外のXbaI部位を除去する)

pA60X99X (5μg)をXbaI (10unit)を含む反応系50μl中で5分間反応させ、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、2ヶ所のXbaI部位のうち1ヶ所のみで切断された23.8kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収した。次に、この断片0.2μgをKlenow酵素(宝酒造製)5unitを含む反応系50μl中で反応させ両末端を平滑化し、さらに、これの1/5量、ATPおよびT4DNAリガーゼを含む反応液(最終容量20μl)中で一晩結合させた。次いでこの反応混液10μlを用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製した。これらのプラスミドDNAをBsrGIおよびXbaIで同時消化し、6.2kbの断片を生じる、すなわ*

5'-CGAACGCGTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTCGAGTCG-3'
3'-GCTTGGCATATTGAAGCATATCGTATGTAATATGCTTCAATAGAGCTCAGC-5'

(下線部分の配列がloxP部位である。)

【0086】一方、プラスミドpA60X99 (10μg)をBsrGI (50unit)を含む反応系50μl中で切断した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、23.8kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収した。このDNA断片0.5μgと前述のloxPを含む64bpのDNA断片0.005μg、ATPおよびT4DNAリガーゼを含むリガーゼ反応液(最終容量25μl)中で一晩結合させた。これの1/2量に滅菌水、BsrGI反応bufferを加えて18μlとしてから、70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた。さらに、20unitのBsrGIを加え(最終容量20μl)37℃で1時間反応させることによりセルフアニーリングにより生じた環状のpA60X99を切断した。次いでこの反応混液10μlを用いて大腸菌DH5αを形質転換し、得られた形質転換体から

* ち図1の構造を有するプラスミドpA60X99 (図3)を得た。

【0084】③ pA2L60X99の作製 (BsrGI部位へのloxPの挿入)

pULL2r (30μg)をXhoI (150unit)を含む反応系125μl中で切断した後、熱処理(70℃、15分間)によりXhoIを失活させた。続いてKlenow酵素(宝酒造製)12unitを含む反応系中で両末端を平滑化し、その後フェノール：クロロホルム(1:1)処理を施した後、エタノール沈澱した。沈澱物を遠心分離により取得し、10mMトリス塩酸(pH7.5)に1mMのEDTAを添加した溶液(TE)60μlに溶解した。次に、これの1/2量と5'末端リン酸化KpnIリンカー(宝酒造製)0.2μg、ATPおよびT4DNAリガーゼを含むリガーゼ反応液(最終容量50μl)中で一晩結合させた。次に、熱処理(70℃、15分間)によりリガーゼを失活させた後、Asp718 (100unit)を含む反応系80μl中で消化した。反応混液をアガロースゲル電気泳動し、loxPを含む64bpのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収した。

【0085】なお、上記のpULL2rは以下のようにして調製した。pUC119 (宝酒造製)を制限酵素Ecl136IIで切断し、アルカリホスファターゼ処理を施した後、末端にMluI部位およびXhoI部位を有しこれが連結するとNruI部位を生じるように設計されているloxP配列を含む下記の合成DNA断片(配列番号:4)とのligation反応を行い該合成DNA断片が2つ挿入されたプラスミドpULL2rを得た。

プラスミドDNAを調製した。

【0087】挿入されたloxPの方向を確認するため、ApaIとMluIの同時消化を行い、反応混液をアガロースゲル電気泳動した。目的とする方向に挿入された場合、366および219bp、逆方向に挿入された場合、334および251bpの断片が生じる。また、NruIで消化した場合、目的とする方向に挿入された場合573bp、逆方向に挿入された場合、533bpの断片が生じる。さらに、DraIとKpnIで同時消化した場合、目的とする方向にloxPが1つ挿入された場合320bp、2つ挿入された場合、384bpの断片が生じる。これら3種の条件をすべて満たす、すなわち、目的とする方向にloxPが1つ挿入された目的のプラスミドpA2L60X99 (図4)を取得した。

【0088】④ pA2L3L6099の作製 (XbaI部位へのloxPの挿入)

pULL2r (20 μ g) をXhoI (100 unit) を含む反応系100 μ l 中で切断した後、熱処理 (70℃、15分間) によりXhoI を失活させた。続いてKlenow酵素 (宝酒造製) 8 unit を含む反応系において両末端を平滑化し、その後フェノール:クロロホルム (1:1) 処理を施した後、エタノール沈澱した。沈澱物を遠心分離により取得し、TE 30 μ l に溶解した。これの全量と5'末端リン酸化SpeI リンカー (宝酒造製) 0.4 μ g、ATPおよびT4 DNAリガーゼを含む反応液 (最終容量50 μ l) 中で一晩結合させ、70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた。さらに、SpeI (54 unit) をを加え消化した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、loxPを含む64 bpのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収した。

【0089】一方、pA2L60X99 (10 μ g) を、XbaI (100 unit) を含む反応系50 μ l において切断した後、反応混液をアガロースゲル電気泳動し、23.8 kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNAを回収した。このDNA断片0.5 μ gと前述のloxPを含む64 bpのDNA断片0.005 μ g、ATPおよびT4 DNAリガーゼを含む反応液 (最終容量16 μ l) 中で一晩結合させた。これに5倍希釈したTE 14 μ l を加え、70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた。次いでこれの1/4量に20 unitのXbaI を添加し (最終容量20 μ l)、セルフアニーリングにより生じた環状のpA2L60X99を切断した。この反応混液10 μ l を用いて大腸菌DH5 α を形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドDNAを調製した。

【0090】挿入されたloxPの方向を確認するため、BglIIとMluIの同時消化を行い、反応混液をアガロースゲル電気泳動した。目的とする方向に挿入された場合、366および503 bp、逆方向に挿入された場合、398および471 bpの断片が生じる。また、ApaIとMluIで同時消化した場合、目的とする方向に挿入された場合660 bp、逆方向に挿入された場合、628 bpの断片が生じる。EcoNIとMluIで消化した場合、目的とする方向に挿入された場合311 bp、逆方向に挿入された場合、343 bpの断片が生じる。さらに、HpaIとSacIで同時消化した場合、目的とする方向にloxPが1つ挿入された場合397 bp、2つ挿入された場合、461 bpの断片が生じる。これら4種の条件をすべて満たす、すなわち、目的とする方向にloxPが1つ挿入された目的のプラスミドpA2L3L6099 (図5) を取得した。

【0091】⑤ pAdex2L3LCAwtの作製
pAdex1CAwt (10 μ g) を、Csp45I

(40 unit) を含む反応系100 μ l 中で切断し、次いで、同反応液中にBamHI (30 unit)、さらにEcoRI (40 unit) を順次添加した。21 kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気泳動によりゲルからDNA断片を回収した。なお、Csp45IおよびEcoRIによる切断は21 kbのBamHI DNA断片を回収する際、他の断片が混入するのを防ぐためである。

【0092】pA2L3L6099 (5 μ g) を、BamHI (30 unit) を含む反応系50 μ l 中で切断した後フェノール:クロロホルム (1:1) 処理を施し、水層をTEで平衡化したSephadex G25によりゲル濾過した。回収したDNA断片0.5 μ gと前述の21 kbのDNA断片0.5 μ g、ATPおよびT4 DNAリガーゼを含む反応液 (最終容量18 μ l) 中で一晩結合させた。70℃で10分間インキュベートすることによりリガーゼを熱失活させた後、1 μ l をイン・ビトロ・パッケージングに用いた。

【0093】即ち、ラムダ・イン・ビトロ・パッケージングキットであるギガバックXL (Stratagene社製) を1/4スケールで用い、残りは-80℃に凍結した。ギガバックXLは42 kb以下のコスミドのパッケージ効率が低いのでインサートが入って大きくなったコスミドをある程度選択することができる。本実験では、10個のコロニーを拾えば大半はインサートを含んでおり、目的のクローン (ウイルスゲノムが正しく連結されたクローン) を容易に得ることができた。コスミドの扱い方については、常法 (斎藤 泉他、実験医学: 7:183-187, 1989) に従って行った。

【0094】パッケージングされたコスミドを大腸菌DH5 α (GibcoBRL) に感染させた。即ち、3枚のAp^r (アンピシリン添加) 寒天プレートと5 mlのAp^r LB (pool) にそれぞれ1/200量、1/20量、1/2量、残り全量を接種し、一晩培養した。poolのminiprep DNAを抽出・調製し、制限酵素DraI切断によりインサートがはいったものの割合を調べた。コロニーは丸ごと寒天ごと取り1.5 mlのAp^r LBで、一晩培養し、miniprep DNAを調製した。次に、各コロニーから調製したコスミドDNAの構造をDraI切断により確認した。目的とする方向に挿入された場合891 bp、逆方向に挿入された場合1.4 kbの断片を生じる。これにより目的とするカセットコスミドpAdex2L3LCAwtを取得した。

【0095】実施例3

(アデノウイルスDNA-末端蛋白複合体 (Ad5 dIX DNA-TPCおよびAdex1CANLacZ DNA-TPC) の調製)

① アデノウイルスDNAとしては、Ad5 dIX (I. Saito et al., J. Virology, vol. 54, 711-719 (19

85))またはAdex1CANLacZを用いる。Ad5dlXをHeLa細胞(Roux 10本分)にまたAdex1CANLacZを293細胞にそれぞれ感染させ、培養を行った。即ち、Ad5-dlXまたはAdex1CANLacZのウイルス液(〜10⁹PFU/ml)を0.2ml/Roux感染させ、3日後に、はがれた細胞を遠心分離により集めた。アデノウイルス粒子のほとんどはメディウム中ではなく細胞の核内にいるので感染細胞からウイルスを精製できる利点がある。

(以下の操作は非無菌的に行う。)

【0096】② 得られた細胞をTris-HCl(pH8.0)に懸濁し、密封型ソニケーターを用いて細胞を破碎し、ウイルスを細胞内から放出させた。

③ 得られた破碎物を遠心分離により沈澱を除いた後、超遠心分離機SW28チューブに塩化セシウム溶液(比重1.43)を入れ、その上に上清を重層し、クッション遠心による濃縮を行った。

【0097】④ 界面直下のウイルス層をSW50.1チューブに移した。界面直下のウイルス層は通常目視でき、ウイルス層とその下層の塩化セシウムを5ml採取した。同時にもう一本に塩化セシウム溶液(比重1.34)を満たした。これらを、35krpm、4℃で一晩超遠心にかけた。次いで、白いウイルスのバンドを分取し、既に勾配ができたチューブに寄せ替えた。さらに、35krpm、4℃4時間以上超遠心にかけた。

【0098】⑤ 白いウイルスのバンドを分取し、等量の8M塩酸グアニジンと室温で混合し、4M塩酸グアニジン飽和塩化セシウムを加えてVTi65チューブに満たした。4M塩酸グアニジンにより、粒子蛋白は変性を受けて解離し、DNA-TPCが放出された。

【0099】⑥ 上記のチューブを、55krpm、15℃で一晩超遠心にかけ、0.2mlずつ分画し、その1μlずつを1μg/mlのエチジウムブロミド水溶液20μlと混合し、蛍光染色することによりDNAの有無を確認する。DNAを含む2〜3フラクションを集めた。

⑦ 500mlのTEに一晩透析(2回)し、-80℃に保存した。こうして得られたAd5dlXおよびAdex1CANLacZ DNA-TPCの量をOD₂₆₀から通常のDNAと同様に算出した。

⑧ 得られたAd5dlXおよびAdex1CANLacZ DNA-TPCを、第3ステップの組換えアデノウイルス作成のため、充分量のAgeIで2時間切断し、Sephadex G25カラムでゲル濾過後、-80℃に保存した。

【0100】なお、DNA-TPCは制限酵素による切断、透析、ゲル濾過はできるが電気泳動・フェノール処理・エタノール沈澱はできない。濃縮法は塩化セシウム平衡遠心しかないのでなるべく濃厚状態に保った。10Rouxの感染細胞から約300μg程度のDNA-T

PCを得ることができた。

⑨ 一部を分取し、泳動用BPB bufferを10μl加えた後に、1μlのプロテイナーゼK(10mg/ml)を加えて37℃で10分間反応させて末端蛋白を消化した。フェノール抽出し、上清をアガロースゲル電気泳動で分離し、完全切断を確認した。AgeI切断DNA-TPC中の制限酵素bufferを、遠心ゲル濾過によって除いた後、分注し-80℃に保存した。

【0101】実施例4

10 (loxP挿入組み換えアデノウイルス(Ad5dlX 2L3LまたはAdex2L3LCANLacZ)の作製)なお、NLacZは大腸菌LacZ遺伝子のN末端にSV40の核移行シグナルを付加したものである。

① 10%FCS添加DMEで培養した293細胞の6cm、10cmシャーレ各1枚用意した。

② 発現ユニットを組み込んだloxPを挿入したコスミドpAdex2L3LCAwT DNAの8μgとAgeIで切断したAd5dlX DNA-TPCまたはAgeIで切断したAdex1CANLacZ DNA-TPCの1μgを混合し、セルフェクト(ファルマシア製)キットを用いて、6cmシャーレ1枚にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行った。6cmシャーレのメディウムの上から混合液を滴下し、培養を続けた。一晩培養(約16時間)し、午前中に培養液を交換し、夕方、コラーゲンコート96穴3枚(原液・10倍希釈・100倍希釈)に、5%FCS添加DMEを用い、各ウエル当たり0.1mlでまき直した。細胞数が各プレートで大きく変わらないように、希釈2枚分には10cmシャーレの293細胞を1/3ずつ混ぜて播いた。

【0102】③ 3〜4日後と8〜10日後に、各ウエルに50μlの10%FCS添加DMEを加えた。293細胞がやせてきたら早めに加えた。ウイルスが増殖し細胞が死滅したウエルが7〜20日の間に現れた。ウエルの細胞が完全に死滅するごとに滅菌パスツールピペットで培養液(死細胞ごと)を滅菌した1.5mlチューブに無菌的に移して、ドライアイスで急凍して-80℃に保存した。

④ 15〜25日で判定は終了した。比較的遅く細胞が死んだウエルから回収した培養液チューブを約10個選り、超音波破碎後、5000rpm10分遠心分離して得られた上清を1次ウイルス液(first seed)として-80℃に保存した。早めにウイルス増殖が起こったウエルは複数のウイルス株の混合感染の可能性が高いからである。

【0103】⑤ 24穴プレートに293細胞を用意し、5%FCS-DME(0.4ml/ウエル)と1次ウイルス液10μlをそれぞれ2ウエルずつ添加した。

⑥ 約3日で細胞が完全に死滅したら、1ウエルは1次ウイルス液作製と同様に超音波破碎と遠心分離で上清を

得、これを2次ウイルス液(second seed)として-80℃に保存した。他の1ウエルの死滅した細胞を5000rpmで5分間遠心し、上清を捨てて細胞だけを-80℃に保存した(セルパック)。10種類のウイルス株のセルパックが集まったら以下の方法で感染細胞の全DNAを抽出した。セルパックには、400μlのcell DNA用TNE(50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 10mM EDTA)、4μlのproteinaseK(10mg/ml)および4μlの10%SDSを加えた。

【0104】⑦ 50℃で1時間処理した後、フェノール・クロロホルム抽出2回、クロロホルム抽出2回、ついでエタノール沈澱により得られた核酸をRNaseを20μg/ml含む50μlのTEに溶かした。その15μlを発現ユニットを切断する酵素の中で認識配列にCGを含む酵素であるXhoIで切断し、発現コスミドカセットのXhoI切断と共に、15cm位の長さのアガロースゲルで一晩電気泳動を行い、パターンを比較した。XhoIは挿入したloxP配列内に認識部位があるので、loxPが2個挿入された切断パターンを示すクローンを選択する。説明できないバンドが薄く見えるクローンは、欠失のあるウイルスとの混合の可能性があるので廃棄した。

【0105】実施例5

(E2A遺伝子欠損アデノウイルスの作製と構造確認)
組み換えアデノウイルスAdex2L3LCANLacZおよびAdex1CANCReをそれぞれmoi=10および3で293細胞に感染させ、培養を行った。なお、NCReは、NLacZと同様、SV40の核移行シグナルをCReのN末端に付加したものである。4日*

PCR反応液組成(総容量20μl)

Tris・HCl (pH8.3)	10 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	1.5 mM
dNTP mixture	0.2 mM
プライマー	各0.2 μM
テンプレートDNA	0.1 ng
Taq polymerase	0.5 unit

PCR反応条件

二本鎖解離	: 95℃	1.5分
アニーリング	: 64℃	1.0分
伸長反応	: 70℃	1.0分
反応サイクル		30回

その結果を図6に示す。プライマーとして(1)と

(4)を用いた場合、393bpと推定されるバンドが検出され、E2A遺伝子が欠失したAdexd123CANLacZの存在が明らかとなった(図6、レーン1)。また、(2)と(3)を用いた場合、221bpと推定されるバンドが検出され、CRe遺伝子産物により切り出された環状のE2A遺伝子の存在が裏付けられた(図6、レーン2)。以上、1および2の結果から、

*目に細胞を回収し、前述の方法によりDNAを調製した。loxPで挟まれた領域(E2A遺伝子を含む)が切り出された構造を有するAdexd123CANLacZの生成を2つの方法で確認した。

【0106】1. SmaI消化

SmaI消化の後、ゲル電気泳動した結果、loxPで挟まれた領域が切り出されて生じる4.7kbの断片が認められた。このバンドとAdex2L3LCANLacZ、Adex1CANCRe、およびAdexd123CANLacZにおいて共通して見られる4.45kbのバンドの濃さの比較から、回収した組換えアデノウイルス中の約30%がAdexd123CANLacZであることが分かった。

【0107】2. PCRによる確認

調製したDNA0.1ngをテンプレートとし、下記の条件でPCRを行い、生成物をアガロースゲル電気泳動により分析した。用いたプライマーは、下記に示すオリゴヌクレオチド(1)(配列番号:5)、オリゴヌクレオチド(2)(配列番号:6)、オリゴヌクレオチド(3)(配列番号:7)およびオリゴヌクレオチド(4)(配列番号:8)である。

(1) 5'-CAACTCCATGCTCAACAGTCC
CCAGGTACA-3'

(2) 5'-GATTTTTTAAACGGCGCAGACG
GCAAG-3'

(3) 5'-GTGAGCTTAGAAAACCCCTTAG
-3'

(4) 5'-AGATACCCCTTTTGCACCTGGT
GCAAGTTAAC-3'

Adex2L3LCANLacZからloxPではさまれた領域(E2A遺伝子を含む)が除去されたAdexd123CANLacZの生成が明らかになった。

【0108】参考例1

<リコンビナーゼCRe遺伝子およびCAGプロモーターを有する組換えアデノウイルスベクターの作製>

(1) リコンビナーゼCRe遺伝子発現用カセットコスミドの作製

① リコンビナーゼCRe遺伝子を含む大腸菌ファージP1DNA(ATCC11303-B23)をテンプレートとし、5'-プライマーとして下記の(配列番号:9)のオリゴヌクレオチドを、3'-プライマーとして下記の(配列番号:10)のオリゴヌクレオチドを、耐

熱性ポリメラーゼとしてNEB社製のVent[®]を用い、以下の条件でPCR反応を行い、生成物をアガロースゲル電気泳動にかけ、約1 kbのバンドを切り出し、*

5'-CGT CTGCAG TGCA TCATGA GTAATTTACTGACCGTACACCAAAATTTGCCTGC-3'

PstI BspHI

3'-GACCTTCTACCGCTAATCGGTAAT TCGCGAGATCT CGG-5'

Aor51HI; XbaI

(下線部分は、制限酵素の認識部位である。)

【0109】PCR反応条件

緩衝液: 10 mMのKCl、20 mMのTris-HCl (pH 8.8)、10 mMの(NH₄)₂SO₄、2 mMのMgSO₄、0.1%のTriton X-100 (NEB社添付の緩衝液を使用)

耐熱性ポリメラーゼ: 2 ユニット

dNTP: 400 μM

プライマー: 1 μM

P1ファージDNA: 1 ng

2本鎖解離温度: 95℃ 1.5分間

アニーリング温度: 60℃ 1.5分間

伸長反応温度: 74℃ 2.0分間

反応サイクル: 20回

【0110】この断片およびpUC19 (宝酒造製) をそれぞれ制限酵素PstI (宝酒造製) およびXbaI (宝酒造製) により同時消化したのち、回収し、モル比が約3:1になるように混合し、T4 DNAリガーゼ (宝酒造製) を用いてligation反応を行った。さらに、この反応混液を用いて大腸菌JM109株 (ATCC 53323) を形質転換した。アンピシリン (100 μg/ml) を添加したLB寒天プレートから形質転換株を拾い、リコンビナーゼCre遺伝子を含むプラスミドpUCCreを得た。

【0111】次に、CAGプロモーターを含むカセットコスミドpAdex1CAwtをSwaIで切断したもの1 μgと、pUCCreをPstIおよびXbaIにより同時消化し、さらにKlenow酵素 (宝酒造製) により両端を平滑化して得た約1 kbの断片0.1 μgとを混合した。

【0112】② 次に、混合液にエタノールを加えてコスミドを沈澱させた。沈澱物を遠心分離により取得し、10 mMトリス-塩酸 (pH 7.5) に1 mMのEDTAを添加した溶液 (TE) の5倍希釈液に溶解した。

③ 得られたコスミドをリガーゼ反応buffer中でATP、T4 DNAリガーゼを加え、最終容量7 μlで一晩結合させた。ついで滅菌水、SwaI反応bufferを加えて48 μlとしてから70℃10分でリガーゼを熱失活させた。この際、プラスミドと異なり、コスミドでは、環状ではなく直鎖状タンデムに結合した巨大分子が効率よくパッケージされる。

【0113】④ 2 μlのSwaI (Boehringer製) を加え、25℃で1時間切断した。SwaI切

* リコンビナーゼCre遺伝子を含む約1 kbのDNA断片を得た。

断を行う意味は、カセットコスミドが発現ユニットをくわえ込むことなく再結合するとSwaI認識配列が再生されるため、このステップで発現ユニットの組み込まれていないコスミドを再切断し、コロニーを作らなくするためである。この方法はインサートをもつカセットコスミドだけを選択する強力な方法である。

⑤ 常法 (Molecular Cloning vol.3 E.34) に従い、カセットコスミドのフェノール抽出、遠心分離、ついでゲル濾過を行った。

⑥ 再度、SwaI切断を行った。即ち、SwaI反応buffer中、5 μlのSwaIを加え、25℃で2時間切断した。その理由は上記の通りである。

【0114】⑦ 得られたコスミドの1 μlについてイン・ビトロ・パッケージングを行った。即ち、ラムダ・イン・ビトロ・パッケージングキットであるギガバックXL (Stratagene製) を1/4スケールで使い、残りは-80℃に凍結した。ギガバックXLは42 kb以下のコスミドのパッケージ効率が低いのでインサートが入って大きくなったコスミドをある程度選択することができる。本実験では、10個のコロニーを拾えば大半はインサートを含んでおり、目的の向き (左向き) のクローンを容易に得ることができた。コスミドの扱い方については、常法 (斎藤 泉他、実験医学: 7: 183-187, 1989) に従って行った。

【0115】⑧ パッケージングされたコスミドを大腸菌DH1 (ATCC 33849) に感染させた。即ち、3枚のAp⁺ (アンピシリン添加) 寒天プレートと5 mlのAp⁺ LB (pool) にそれぞれ1/200量、1/20量、1/2量、残り全量を接種し、一晩培養した。poolのminiprep DNAを抽出・調製し、全酵素切断によりインサートが入ったものの割合を調べた。コロニーは丸ごと寒天ごと取り1.5 mlのAp⁺ LBで、一晩培養し、miniprep DNAを調製した。

⑨ 次に、制限酵素切断により、発現ユニットの向きと構造を確認した。なお、NruIとリガーゼを用いて、発現単位を含むが大部分のアデノウイルスDNAを欠失したプラスミドを作製し、DNAを調製して、cDNAクローン化の最終確認をした。

【0116】(2) アデノウイルスDNA-末端蛋白複合体 (Ad5 dIX DNA-TPC) の調製

① アデノウイルスDNAとしては、Ad5 dIX (I. Saito et al., J. Virology, vol. 54, 711-719 (19

85))を用いた。Ad5 d1Xを293細胞(Roux 10本分)に感染させ、培養を行った。即ち、Ad5-d1Xのウイルス液(〜10⁸ PFU/ml)を0.2 ml/Roux感染させ、3日後に、はがれた細胞を1500 rpm、5分にて遠心分離して集めた。アデノウイルス粒子のほとんどはメディウム中ではなく細胞の核内にいるので感染細胞からウイルスを精製できる利点がある。(以下の操作は非無菌的に行った。)

【0117】② 得られた細胞を10 mMのTris-HCl (pH 8.0)の20 mlに懸濁し、密封型ソニケーターを用い、200 W、2分(30秒×4)で細胞を破碎し、ウイルスを細胞内から放出させた。ウイルスを細胞内から放出させるには5 ml以下なら凍結融解5回でもよいが、それ以上の容量ではソニケーターが便利である。ただし、必ず密封型(専用カップのあるもの)を用いる。通常の投げ込み型は、たとえ安全キャビネットの中でも危険性がある。

【0118】③ 得られた破碎物を遠心分離(10 k rpm、10分)により沈澱を除いた後、超遠心機 SW28チューブに15 mlの塩化セシウム溶液(比重1.43)を入れ、その上に上清を重層し、クッション遠心(25 k rpm、1時間、4℃)による濃縮を行った。

④ 界面直下のウイルス層をSW50.1チューブに移した。界面直下のウイルス層は通常目視でき、ウイルス層とその下層の塩化セシウムを5 ml採取した。同時にもう一本に塩化セシウム溶液(比重1.34)を満たした。これらを、35 k rpm、4℃で一晩超遠心にかけた。次いで、白いウイルスのバンドを分取し、既に勾配ができたチューブに乗せ替えた。さらに、35 k rpm、4℃4時間以上超遠心にかけた。

【0119】⑤ 白いウイルスのバンドを分取し、等量の8 M塩酸グアニジンと室温で混合し、4 M塩酸グアニジン飽和塩化セシウムを加えてVTi65チューブに満たした。4 M塩酸グアニジンにより、粒子蛋白は変性を受けて解離し、DNA-TPCが放出された。エチジウムブロミドは後で除く方法が確立されていないため利用できなかった。

【0120】⑥ 上記のチューブを、55 k rpm、15℃で一晩超遠心にかけ、0.2 mlずつ分画し、その1 μlずつを1 μg/mlのエチジウムブロミド水溶液20 μlと混合し、蛍光染色することによりDNAの有無を確認した。DNAを含む2〜3フラクションを集めた。

⑦ 500 mlのTEに一晩透析(2回)し、-80℃に保存した。こうして得られたAd5 d1X DNA-TPCの量をOD₂₆₀から通常のDNAと同様に算出した。

【0121】⑧ 得られたAd5 d1X DNA-TPCを、第3ステップの組換えアデノウイルス作成のため、充分量のEcoT22Iで2時間切断した後、-8

0℃に保存した。

【0122】なお、DNA-TPCは制限酵素による切断、透析、ゲル濾過はできるが電気泳動・フェノール処理・エタノール沈澱はできなかった。濃縮法は塩化セシウム平衡遠心しかないのなるべく濃厚状態に保った。10 Rouxの感染細胞から約300 μg程度のDNA-TPCを得ることができた。

⑨ 一部を分取し、泳動用BPB bufferを10 μl加えた後に、1 μlのプロテイナーゼK(10 mg/ml)を加えて37℃で10分間反応させて末端蛋白を消化した。フェノール抽出し、上清をアガロースゲル電気泳動で分離し、完全切断を確認した。EcoT22I切断DNA-TPC中の制限酵素bufferを、遠心ゲル濾過によって除いた後、分注し-80℃に保存した。

【0123】(3) 組換えウイルスの分離と高力価ウイルス液の作製

① 10% FCS添加DMEで培養した293細胞の6 cm、10 cmシャーレ各1枚用意した。

② 発現ユニットを組み込んだpAdex1w DNAの8 μg(3〜9 μgが適当である)とEcoT22Iで切断したAd5 d1X DNA-TPCの1 μgを混合し、セルフエクト(ファルマシア製)キットを用いて、6 cmシャーレ1枚にリン酸カルシウム法でトランスフェクションを行った。6 cmシャーレのメディウムの上から混合液を滴下し、培養を続けた。一晩培養(約16時間)し、午前中に培養液を交換し、夕方、コラーゲンコート96穴3枚(原液・10倍希釈・100倍希釈)に、5% FCS添加DMEを用い、各ウェル当たり0.1 mlでまき直した。細胞数が各プレートで大きく変わらないように、希釈2枚分には10 cmシャーレの293細胞を1/3ずつ混ぜて播いた。

【0124】③ 3〜4日後と8〜10日後に、各ウェルに50 μlの5% FCS添加DMEを加えた。293細胞がやせてきたら早めに加えた。ウイルスが増殖し細胞が死滅したウェルが7〜15日の間に現れた。ウェルの細胞が完全に死滅するごとに滅菌パスツールピペットで培養液(死細胞ごと)を滅菌した1.5 mlチューブに無菌的に移して、ドライアイスで急凍して-80℃に保存した。

④ 15〜18日で判定は終了した。比較的遅く細胞が死んだウェルから回収した培養液チューブを約10個選り、凍結融解6回後、5 k rpm 10分遠心して得られた上清を1次ウイルス液(first seed)として-80℃に保存した。早めにウイルス増殖が起こったウェルは複数のウイルス株の混合感染の可能性が高いからである。

【0125】⑤ 24穴プレートに293細胞を用意し、5% FCS-DME(0.4 ml/ウェル)と1次ウイルス液10 μlをそれぞれ2ウェルずつ添加した。

⑥ 約3日で細胞が完全に死滅したら、1ウェルは1次

ウイルス液作製と同様に6回の凍結融解と遠心で上清を得、これを2次ウイルス液(second seed)として-80℃に保存した。2次ウイルス液の力価は $10^7 \sim 10^8$ PFU/ml程度であった。他の1ウエルの死滅した細胞を5krpmで5分間遠心し、上清を捨てて細胞だけを-80℃に保存した(セルパック)。10種類のウイルス株のセルパックが集まったら以下の方法で感染細胞の全DNAを抽出した。セルパックには、400μlのcell DNA用TNE (50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 10mMEDTA)、4μlのproteinaseK (10mg/ml) および4μlの10%SDSを加えた。

【0126】⑦ 50℃で1時間処理した後、フェノール・クロロホルム抽出2回、クロロホルム抽出2回、ついでエタノール沈澱により得られた核酸をRNAseを20μg/ml含む50μlのTEに溶かした。その15μlを発現ユニットを切断する酵素の中で認識配列にCGを含む酵素であるXhoIで切断し、発現コスミドカセットのXhoI切断と共に、15cm位の長さのアガロースゲルで一晩電気泳動を行い、パターンを比較した。発現ユニット内の切断点からアデノウイルスゲノムの左端までのバンドが正確に出現しているものを選択した。また、説明できないバンドが薄く見えるクローンは、欠失のあるウイルスとの混合の可能性があるので廃棄した。アデノウイルスDNAは細胞あたり10,000コピーに増殖するので、細胞DNAと一緒に全DNAを抽出し制限酵素切断によりウイルスDNAのバンドをみることができる。XhoIなどのように認識配列にCGを含む酵素は、細胞DNAを切断しないので、パターンが見やすい。これ以外の酵素を用いるときは、非感染293細胞DNAをコントロールにしておくことが必要であった。(ヒト細胞の反復配列由来のバンドが出現した)。

【0127】⑧ XhoI切断で同定された目的のウイルス株の2次ウイルス液の0.1mlを、コラーゲンコートした150cm² ボトル(培地は25ml)の293細胞へ感染させた。3日後に細胞が死滅したら、死細胞ごと25mlの培地を無菌的に密閉型ソニケーター2*

配列

ATAACTTCGT ATAGCATACA TTATACGAAG TTAT

【0130】配列番号: 2

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列

CGATTTAAAT CGATTGTCGA CTCGCGA

【0131】配列番号: 3

配列の長さ: 36

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

* 00w最高出力2分(30秒×4回)で破碎してウイルスを遊離させた。3krpm、4℃で10分間遠心して沈澱を除去し、5ml凍結用チューブに2mlずつ13本に分注し、ドライアイスで急凍して-80℃に保存し、3次ウイルス液を調製した。3次ウイルス液は本発明の組換えアデノウイルスを含む液であり、 10^8 PFU/ml程度の高力価のものであった。なお、3次ウイルス液5μlを24穴プレートの293細胞1ウエルに感染し、増殖したウイルスDNAの酵素切断パターンを上記の方法で確認した。もし、欠失ウイルスあるいは親ウイルスとの混合物であることが疑われたら、2次ウイルス液の段階で既にわずかに混在していた欠失ウイルスが増殖が早いため見えてきた可能性があるもので、全ての3次シードを廃棄して、別の2次ウイルス液から改めてやり直すか、その1次ウイルス液から限界希釈法により、目的のウイルスを純化した。

【0128】

【発明の効果】本発明により、広範な動物細胞に外来遺伝子を安定な形で導入することのできる組換えDNAウイルスを提供することができる。また、本発明はこの組換えDNAウイルスの簡易な製造方法を提供する。特に、本発明の組換えアデノウイルスは遺伝病の治療に有用である。

【0129】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 34

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

ハイボセティカル配列: NO

アンチセンス: NO

起源: 大腸菌ファージP1 DNA

配列の特徴

特徴を決定した方法: S

※配列の種類: 他の核酸(合成された任意のDNA)

ハイボセティカル配列: YES

アンチセンス: NO

配列の特徴

特徴を決定した方法: S

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸(合成された任意のDNA)

ハイボセティカル配列: YES

アンチセンス: NO

配列の特徴

* * 特徴を決定した方法 : S

配列

ATCGATTCTA GACTAGTTTA ATTAATTTAA ATCGAT

36

【0132】配列番号 : 4

※DNA)

配列の長さ : 52

ハイボセティカル配列 : YES

配列の型 : 核酸

アンチセンス : NO

鎖の数 : 二本鎖

起源 : 大腸菌ファージ P1 DNA

トポロジー : 直鎖状

配列の特徴

配列の種類 : 他の核酸 (一部Genomic DNA を含む任意の※

特徴を決定した方法 : S

配列

CGAACGCGTA TAACTTCGTA TAGCATACAT TATACGAAGT TATCTCGAGT CG

52

【0133】配列番号 : 5

★DNA)

配列の長さ : 30

ハイボセティカル配列 : YES

配列の型 : 核酸

アンチセンス : NO

鎖の数 : 一本鎖

配列の特徴

トポロジー : 直鎖状

特徴を決定した方法 : S

配列の種類 : 他の核酸 (一部Genomic DNA を含む任意の★

配列

CAACTCCATG CTCACAGTC CCCAGGTACA

30

【0134】配列番号 : 6

☆DNA)

配列の長さ : 26

ハイボセティカル配列 : YES

配列の型 : 核酸

アンチセンス : NO

鎖の数 : 一本鎖

配列の特徴

トポロジー : 直鎖状

特徴を決定した方法 : S

配列の種類 : 他の核酸 (一部Genomic DNA を含む任意の☆

配列

GATTTTAAA CGGCGCAGAC GGCAAG

26

【0135】配列番号 : 7

◆DNA)

配列の長さ : 21

ハイボセティカル配列 : YES

配列の型 : 核酸

30 アンチセンス : NO

鎖の数 : 一本鎖

配列の特徴

トポロジー : 直鎖状

特徴を決定した方法 : S

配列の種類 : 他の核酸 (一部Genomic DNA を含む任意の◆

配列

GTGAGCTTAG AAAACCCTTA G

21

【0136】配列番号 : 8

DNA)

配列の長さ : 31

ハイボセティカル配列 : YES

配列の型 : 核酸

アンチセンス : NO

鎖の数 : 一本鎖

配列の特徴

トポロジー : 直鎖状

40 特徴を決定した方法 : S

配列の種類 : 他の核酸 (一部Genomic DNA を含む任意の

配列

AGATACCCCT TTTGCACTGG TGCAAGTTAA C

31

【0137】配列番号 : 9

DNA)

配列の長さ : 53

ハイボセティカル配列 : YES

配列の型 : 核酸

アンチセンス : NO

鎖の数 : 一本鎖

起源 : 大腸菌ファージ P1 DNA

トポロジー : 直鎖状

配列の特徴

配列の種類 : 他の核酸 (一部Genomic DNA を含む任意の

特徴を決定した方法 : S

配列

50

45

46

CGTCTGCAGT GCATCATGAG TAATTTACTG ACCGTACACC AAAATTTGCC TGC

53

【0138】配列番号: 10

配列の長さ: 38

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (一部Genomic DNA を含む任意の*

配列

GGCTCTAGAG CGCTTAATGG CTAATCGCCA TCTCCAG

38

【0139】配列番号: 11

配列の長さ: 119

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (一部Genomic DNA を含む任意の※

配列

CATGTAATTT AAATCTCGAG ATAACCTCGT ATAATGTATG CTATACGAAG TTATACGCGT 60

ATTTAAATGT AAAAATAATG TACTAGAGAC ACTTCAATA AAGGCAATG CTTTATTT 119

【0140】配列番号: 12

配列の長さ: 115

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (一部Genomic DNA を含む任意の★

配列

GTACACTCTC GGGTGATTAT TTACCCAC CTTGCCGTC TCGCCGATT TAAATCTCGA 60

GATAACTTCG TATAATGTAT GCTATACGAA GTTATACGG TATTAAATC CGTTT 115

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、コスミドpAdex1cwの構造を示す概念図である。

【図2】図2は、コスミドpAdex1CAwtの構造を示す概念図である。

【図3】図3は、プラスミドpA60X99の構造を示す概念図である。

【図4】図4は、プラスミドpA2L60X99の構造を示す概念図である。

* DNA)

ハイボセティカル配列: YES

アンチセンス: NO

起源: 大腸菌ファージP1 DNA

配列の特徴

特徴を決定した方法: S

※ DNA)

ハイボセティカル配列: YES

アンチセンス: NO

起源: 大腸菌ファージP1 DNA

配列の特徴

特徴を決定した方法: S

★ DNA)

20 ハイボセティカル配列: YES

アンチセンス: NO

起源: 大腸菌ファージP1 DNA

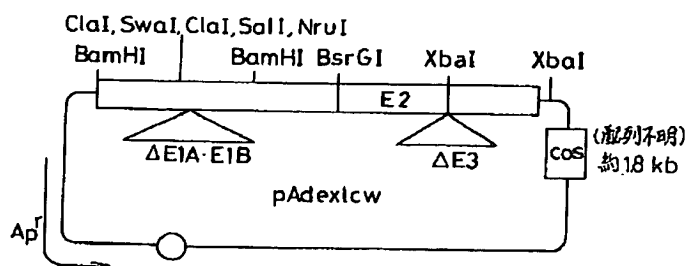
配列の特徴

特徴を決定した方法: S

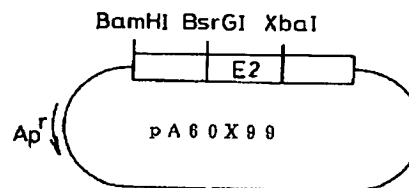
☆【図5】図5は、プラスミドpA2L3L6099の構造を示す概念図である。

30 【図6】図6は、組換えアデノウイルスAdex2L3LCANLacZおよびAdex1CANCReを293細胞に共感染させた後に回収した細胞からDNAを抽出し、これをテンプレートとしてPCRを行った結果を示す図である。レーン1はプライマー(1)と(4)を用いた場合、レーン2はプライマー(2)と(3)を用いた場合の電気泳動図をそれぞれ示す。

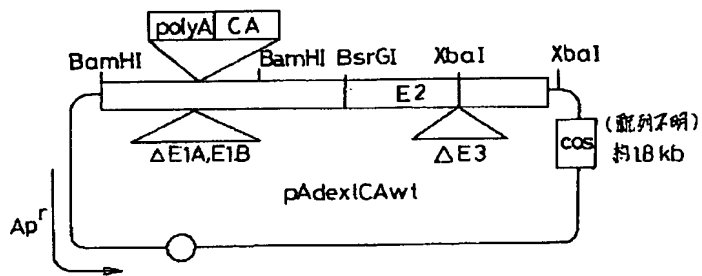
【図1】



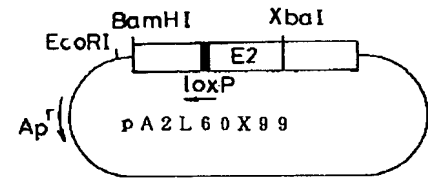
【図3】



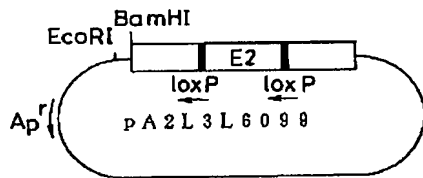
【図 2】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

